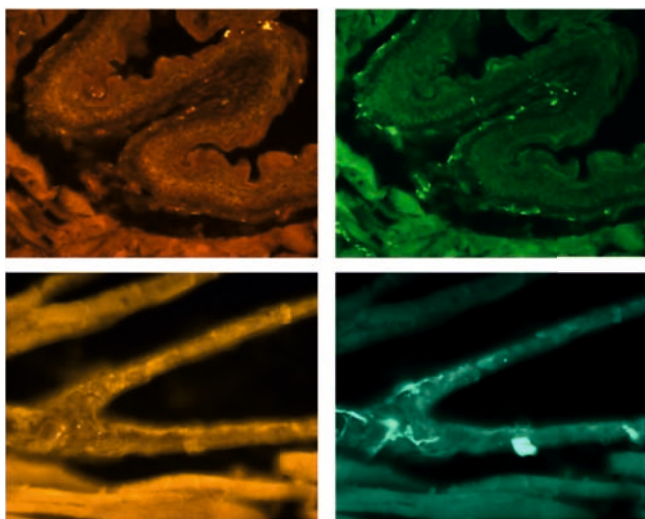


Die cholinerge und nicht-cholinerge Innervation der Thoraxorgane der Maus

Anastasia Fiebig



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2016

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Die cholinerge und nicht-cholinerge Innervation der Thoraxorgane der Maus

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Anastasia Fiebig, geb. Klein

aus Balchasch

Gießen 2015

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
unter der Leitung von Prof. Dr. E. Baumgart-Vogt

Gutachter: Prof. Dr. W. Kummer

Gutachter: Prof. Dr. K. Lips

Tag der Disputation: 25.05.2016

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Autonome und sensible Innervation der Brustraumorgane	2
1.1.1 Innervation der Lunge und der unteren Atemwege	2
1.1.2 Nicht-adrenerges, nicht-cholinerges System (NANC)	4
1.1.3 Innervation des Herzens	5
1.2 Mediatoren und Enzyme des autonomen Nervensystems	6
1.2.1 Acetylcholin (ACh).....	6
1.2.2 Protein gene product 9.5 (PGP 9.5)	8
1.2.3 Vasoaktives intestinales Peptid (VIP)	8
1.2.4 Neuropeptid Tyrosin (NPY)	9
1.2.5 Tyrosinhydroxylase (TH).....	11
1.2.6 Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP)	11
1.2.7 Substanz P (SP).....	12
1.2.8 Stickstoffmonoxid (NO)	14
1.3 Zielsetzung der Arbeit	15
2. Material und Methoden	17
2.1 Versuchstiere und Gewebeaufbereitung	17
2.2 AChE-Histochemie kombiniert mit α -smooth-muscle-actin (α -SMA)- Immunfluoreszenz	18
2.2.1 Antikörper	18
2.2.2 Verwendete Lösungen.....	19
2.3 Auswertung	20
2.4 Immunhistochemie	20
2.4.1 Antikörper	21
2.4.2 Verwendete Lösungen.....	22
2.5 NADPH-Diaphorase-Reaktion	24
3. Ergebnisse	25
3.1 Histochemische Darstellung der Acetylcholinesterase-Aktivität	25
3.2. Doppelmarkierung von VAcHT und PGP 9.5.....	26
3.2.1 Trachea, Lunge und Pulmonalgefäße	26
3.2.2 Herz, Koronararterien und Ösophagus	27
3.2.3 Parasympathische Ganglien.....	28

3.3 Doppelmarkierung von VAcHT und VIP	36
3.3.1 Trachea, Lunge und Pulmonalgefäße	36
3.3.2 Herz, Koronararterien und Ösophagus	37
3.3.3 Parasympathische Ganglien.....	38
3.4 Doppelmarkierung von VAcHT und NPY	42
3.4.1 Trachea, Lunge und Pulmonalgefäße	42
3.4.2. Herz, Koronararterien und Ösophagus	43
3.4.3 Parasympathische Ganglien.....	44
3.5 Doppelmarkierung von VAcHT und TH.....	50
3.5.1 Trachea, Lunge und Pulmonalgefäße	50
3.5.2 Herz, Koronargefäße und Ösophagus.....	50
3.5.3 Parasympathische Ganglien.....	51
3.6 Doppelmarkierung von VAcHT und CGRP	55
3.6.1 Trachea, Lunge und Pulmonalgefäße	55
3.6.2 Herz, Koronararterien und Gefäße	56
3.6.3 Parasympathische Ganglien.....	56
3.7 Doppelmarkierung von VAcHT und SP	64
3.7.1 Trachea, Lunge und Pulmonalgefäße	64
3.7.2 Herz, Koronararterien und Ösophagus	64
3.7.3 Parasympathische Ganglien.....	65
3.8 Darstellung der Stickstoffoxidsynthase durch die NADPH-Diaphorase-Reaktion in den Brustraumorganen.....	70
3.8.1 Trachea, Lunge und Pulmonalgefäße	70
3.8.2 Herz, Aorta und Ösophagus	70
3.8.3 Parasympathische Ganglien.....	70
4. Diskussion	76
4.1 Innervationsdichte cholinерger Fasern.....	76
4.2 Die Innervation des Respirationstrakts und der Pulmonalgefäße.....	77
4.2.1 PGP 9.5-immunreaktive Fasern	77
4.2.2 VAcHT-immunreaktive Nervenfasern	78
4.2.3 VIP-immunreaktive Nervenfasern.....	79
4.2.4 NPY-immunreaktive Fasern	80
4.2.5 TH-immunreaktive Fasern.....	82
4.2.6 CGRP-immunreaktive Fasern.....	83

4.2.7 SP-immunreaktive Nervenfasern.....	85
4.2.8 NADPH-positive Fasern.....	86
4.3 Die Innervation des Herzens und der Koronargefäße.....	88
4.3.1 PGP 9.5- immunreaktive Fasern.....	88
4.3.2 VACht-immunreaktive Fasern	89
4.3.3 VIP-immunreaktive Fasern.....	89
4.3.4 NPY-immunreaktive Fasern	90
4.3.5 TH-immunreaktive Fasern.....	91
4.3.6 CGRP-immunreaktive Fasern.....	92
4.3.7 SP-immunreaktive Fasern.....	93
4.3.8 NADPH-Diaphorase positive Fasern.....	94
4.4 Schlussfolgerung	95
5. Zusammenfassung.....	97
6. Summary	98
8. Abkürzungsverzeichnis.....	99
9. Tabellenverzeichnis	100
10. Abbildungsverzeichnis	100
11. Literaturverzeichnis	103
12. Eidesstattliche Erklärung	133
13. Danksagung.....	134
14. Lebenslauf	135

1. Einleitung

Der britische Physiologe Langley unterteilte Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts das autonome Nervensystem in drei funktionelle Kategorien: den Sympathikus, den Parasympathikus und das enterale Nervensystem (Langley, 1905, 1906). Jahrzehnte später gelang es Loewi, die Freisetzung chemischer Neurotransmitter nachzuweisen (Loewi 1921) und Dale erstmals die Wirkung des Acetylcholin (ACh) als Neurotransmitters zu beschreiben (Dale 1935). In folgenden Untersuchungen wurde ACh als Transmittersubstanz an prä- und postganglionär parasympathischen sowie an präganglionär sympathischen Neuronen identifiziert (Loewi und Navratil 1926; Uvnas 1954). Im Laufe der Zeit konnten weitere Transmittersubstanzen im autonomen Nervensystem nachgewiesen werden, die zusammen mit ACh oder Noradrenalin (NA), dem klassischen Transmitter postganglionärer sympathischer Neurone (Euler 1946), als sogenannte Kotransmitter freigesetzt werden. Dabei konnte beobachtet werden, dass bei gleichzeitiger Blockade aller cholinergen und adrenerger Rezeptoren weiterhin Reaktionen nach Nervenstimulation nachweisbar waren. Dies legt die Vermutung nahe, dass neben dem klassischen cholinergen oder adrenergen System ein eigenständiges, nicht-adrenerges nicht-cholineres (NANC) System existiert (Barnes et al., 1991a; Lei et al., 1993; Widdicombe, 1998). Jede Wirkung, die nach Blockade aller adrenergen und cholinergen Rezeptoren durch Nervenstimulation hervorgerufen wird, wird seither als NANC bezeichnet. Mittlerweile weiß man, dass eigenständige NANC-Neuronen zwar vorhanden sind, oft jedoch die Transmittersubstanzen zusammen mit ACh oder NA als Kotransmitter ausgeschüttet werden und nicht wie initial vermutet völlig unabhängig von ihnen freigesetzt werden (Fischer et al., 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Gesamtnnervation sowie die NANC Innervation der Thoraxorgane der Maus, insbesondere die der Lunge untersucht. Der Schwerpunkt lag dabei auf dem Nachweis möglicher Kotransmitter mit ACh und dem daraus resultierenden Hinweis auf das Vorhandensein eines eigenständigen NANC-Systems. Da ACh als stärkster Bronchokonstriktor in der Innervation des Respirationstraktes eine wichtige Stellung einnimmt, waren diese Nervenfasern von besonderer Bedeutung, so dass deren Verteilung und Innervationsdichte in verschiedenen Abschnitten des bronchopulmonalen Systems zusätzlich untersucht und quantitativ erfasst wurden.

1.1 Autonome und sensible Innervation der Brustraumorgane

1.1.1 Innervation der Lunge und der unteren Atemwege

Die Lunge und die unteren Atemwege werden sympathisch, parasympathisch und sensibel innerviert. Die Nervenfasern dieser drei Subsysteme vereinigen sich hinter der Trachea zu einem dichten Nervengeflecht und treten durch den Lungenhilus in die Lunge ein (Dinh et al., 2006a).

Im Nucleus dorsalis nervi vagi und im Nucleus ambiguus liegen die präganglionär parasympathischen Neurone, die ihre Axone als einen Teil des N. vagus zu den an den Atemwegen gelegenen Ganglien entsenden (Hollenberg, 1986). Von diesen Ganglien ziehen postganglionäre Nervenfasern zu den Zielgebieten der unteren Atemwege. Der Transmitter aller präganglionären sowie der postganglionären parasympathischen Fasern ist ACh (Loewi et Navratil 1926, Uvnäs 1954) und kann in Nervenfasern vor allem in der Atemwegsmuskulatur der Trachea bis zu den Bronchioli terminales nachgewiesen werden (Canning und Fischer, 1997a; Fischer et al., 1996a), wo er nach Freisetzung durch Bindung an muskarinerge Rezeptoren eine Bronchokonstriktion und Schleimsekretion hervorruft (Partanen et al., 1982; Caulfield und Birdsall, 1998; Matera et al., 2002). In postganglionären Neuronen sind neben ACh Substanzen wie vasoaktives intestinales Peptid (VIP) und Neuropeptid Tyrosin (NPY) nachgewiesen worden (Fischer et al., 1996a). Auch im Ösophagus liegen Zellkörper, aus denen Neurone zur Innervation der Trachealmuskulatur entspringen. Als Transmitter verwenden sie jedoch VIP, Stickstoffmonoxid (NO) und NPY (Fischer et al., 1996a; Moffatt et al., 1998) und sind womöglich der Ursprung VIP- und NOS-immunreaktiver Fasern (Kummer, 1992). In Untersuchungen am Meerschweinchen konnte gezeigt werden, dass diese Neurone eine nicht-adrenerge, nicht-cholinerge Bronchodilatation bewirkten (Canning et al., 1998a).

Im Nucleus intermediolateralis und Nucleus intercalatus des Rückenmarks liegen die präganglionären Neurone des Sympathikus. Sie ziehen zu den paravertebralen Ganglien, die rechts und links einen Grenzstrang, den Truncus sympathicus, bilden. Dort werden die Fasern auf postganglionäre Neurone umgeschaltet, die zu den Zielorganen ziehen (Deuschl und Illert, 1981; Ito et al., 2007; Ming und Wang, 1989; Pyner und Coote, 1995). Als Ursprung dieser postganglionären Neurone konnten durch Tracingexperimente an der Lunge und der Trachea des Meerschweinchens das Ganglion

stellatum, das Ganglion cervicale superius und medius sowie thorakale Ganglien T2-T4 identifiziert werden (Kummer, 1992). Der präganglionäre Transmitter sympathischer Neurone ist ACh, der postganglionäre dagegen meist NA. Wie beim Parasympathikus finden sich auch im sympathischen Nervensystem Koexpressionen mehrerer Transmitter. Neben ACh wird präganglionär auch NO gefunden, während postganglionär eine Freisetzung des NA mit NPY beschrieben worden ist (Lindh et al., 1986; Lundberg et al., 1988; Kummer et al., 1992; Maggi et al., 1995). Durch Stimulation sympathischer Neurone wird NA freigesetzt und wirkt bei Bindung an β_1 -Rezeptoren am Herzens positiv ino-, chrono- und dromotrop, bei Bindung an β_2 -Rezeptoren wird in der Lunge eine Broncho- und Vasodilatation ausgelöst (Andersson und Grundström, 1987; Carswell und Nahorski, 1983; Rugg et al., 1978).

Die Fasern zur sensiblen Innervation der Lunge und der unteren Atemwege entspringen aus dem Ganglion jugulare und dem Ganglion nodosum, den sensorischen Ganglien des N. vagus, und enden im Nucleus tractus solitarii (Fischer et al., 1996; Kummer, 1992; Springall et al., 1987). Zusätzlich erhält die Lunge afferente Fasern aus den oberen thorakalen Spinalganglien, die zusammen mit den Rami pulmonales des Truncus sympathicus die Lunge erreichen (Dalsgaard und Lundberg, 1984; Kummer et al., 1992; Lundberg et al., 1988). An Trachea, den Bronchi und Bronchioli, sowie unter der Pleura sind Dehnungs- und Mechanorezeptoren enthalten. Diese sensorischen Fasern lassen sich in vier Haupttypen gliedern:

1. Langsam adaptierende Dehnungsrezeptoren (Slowly adapting stretch receptors = SAR), die überwiegend in der glatten Muskulatur der Trachea und der Bronchien nachweisbar sind. Ihre Fasern sind myelinisiert und haben ihren Ursprung im Ganglion jugulare (Guz und Trenchard, 1971a; Riccio et al., 1996). Durch die Myelinisierung können hohe Leitungsgeschwindigkeiten bis 5 m/s erreicht werden (Coleridge und Coleridge, 1984; Sant'Ambrogio und Widdicombe, 2001). Sie regulieren die Atemmechanik und den Muskeltonus und schützen die Lunge vor Überdehnung (Widdicombe und Wells, 1994).
2. Schnell adaptierende Dehnungsrezeptoren (Rapidly adapting stretch receptors = RAR) sind Irritanzenrezeptoren, die sich in der glatten Atemwegsmuskulatur und im respiratorischen Epithel befinden (Coleridge und Coleridge, 1984; Widdicombe und Wells, 1994) und aus dem Ganglion nodosum entspringen (Riccio et al., 1996). Auch ihre Fasern sind myelinisiert und werden durch

entzündliche, chemische oder mechanische Reize aktiviert (Sant'Ambrogio und Widdicombe, 2001).

3. Die C-Faser-Rezeptoren in der Trachea, den Bronchien, dem Lungenparenchym und entlang der Bronchial- und Lungengefäße sind nicht myelinisiert und mit Geschwindigkeiten < 1 m/s langsam leitend (Coleridge und Coleridge, 1984; Widdicombe und Wells, 1994). Sie entspringen aus dem Ganglion jugulare (Riccio et al., 1996) und sind in der Lage, proinflammatorische Neuropeptide wie Substanz P (SP), Neurokinin A (NKA) und Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) freizusetzen. Dies bewirkt eine neurogene Entzündung und führt zu einer Vasodilatation, Bronchokonstriktion, Schleimhautschwellung und zu einer gesteigerten Mukussekretion (Nadel, 1990).
4. „Cough receptors“ bewirken als Reaktion auf SP oder Histamin eine Bronchokonstriktion und lösen einen Hustenreflex aus. Ihre Nervenfasern sind myelinisiert und erreichen eine Leitungsgeschwindigkeit von 5 m/s (Canning, 2006). Sie haben ihren Ursprung im Ganglion nodosum und enden in der Schleimhaut der Atemwege (Canning, 2006).

1.1.2 Nicht-adrenerges, nicht-cholinerges System (NANC)

Nach pharmakologischer Definition wird jede Wirkung, die nach Blockade aller adrenergen und cholinergen Rezeptoren durch Nervenstimulation hervorgerufen wird, als NANC bezeichnet (Barnes et al., 1991; Lei et al., 1993; Widdicombe, 1998). Nach anfänglicher Vermutung, dass Neurone, die NANC-Effekte vermitteln, weder ACh noch NA als Transmitter benutzen und daher ein eigenständiges System bilden, weiß man mittlerweile, dass die Transmittersubstanzen meistens zusammen mit ACh oder NA als Kotransmitter ausgeschüttet werden und nicht, wie initial angenommen, von einer weiteren Population von Neuronen, die weder ACh noch NA bildet (Fischer et al., 1998). NANC-Mediatoren erlangen in der aktuellen Forschung immer mehr an Bedeutung und stehen unter dem Verdacht, an der Pathogenese chronisch entzündlicher Lungenerkrankungen beteiligt zu sein. Die Mediatoren des NANC-Systems an der glatten Muskulatur werden in zwei Gruppen unterteilt: die des exzitatorischen-NANC-System (eNANC), zu dem SP, NKA und CGRP gezählt werden und die des

inhibitorischen NANC-Systems (iNANC), welches NO, VIP und NPY beinhaltet (Widdicombe, 1998). Die Wirkungsweise eines NANC-Systems an der Atemwegsmuskulatur, den Blutgefäßen, der glatten Muskulatur sowie an den Drüsen ist unterschiedlich und abhängig von den Eigenschaften der jeweiligen Substanz (Widdicombe, 1998). So kann zum Beispiel NPY an der Gefäßmuskulatur eine Vasokonstriktion bewirken, während es an der Atemwegsmuskulatur zu einer Bronchodilatation führt (Widdicombe, 1998).

1.1.3 Innervation des Herzens

Die parasympathische Innervation des Herzens hat ihren Ursprung im Nucleus ambiguus und im Nucleus dorsalis nervi vagi (Steele und Choate, 1994). Der N. vagus teilt sich in Rami cardiaci cervicales superiores et inferiores und in Rami cardiaci thoracici, die sich in der Nähe des Herzens zum Plexus cardiacus vereinigen (Franco-Cereceda et al., 1988). In den Ganglien des Plexus cardiacus werden präganglionäre Fasern auf postganglionäre umgeschaltet. Die Nervenfasern verwenden ACh als Transmitter und innervieren das Reizleitungssystem, das Myokard, lokale Ganglien und Koronargefäße (Mawe et al., 1996). Dabei wird über muskarinerge Rezeptoren eine negativ chrono-, dromo- und inotrope Wirkung ausgelöst (Jeck et al., 1988; Schulze und Fu, 1996a; Zhu et al., 1996). Neben ACh konnte in einigen Fasern auch eine Immunreaktivität für NPY und NOS nachgewiesen werden (Dalsgaard et al., 1986; Hassall et al., 1992; Kennedy et al., 1998; Klimaschewski et al., 1992). Aus dem Ganglion nodosum entspringen sensorische Nervenfasern, die auch im Plexus cardiacus enthalten sind (Franco-Cereceda et al., 1988). Sie endigen im Nucleus tractus solitarii. Fasern aus Spinalganglienneuronen endigen im Zervikal- (C3-C4) und Thorakalmark (T1-T7) (Lawrence und Jarrott, 1996; Xie et al., 1999). Die Aktivierung sensorischer Nervenfasern bewirkt eine Hemmung des kardialen Sympathikus und führt zu einer Aktivierung des kardialen Parasympathikus (Behrends et al., 2012). Aus dem Ganglion stellatum, dem Ganglion cervicale superius und inferius, sowie aus den ersten vier Grenzstrangganglien entspringen Fasern zur sympathischen Innervation des Herzens (Franco-Cereceda et al., 1988). Die postganglionären Fasern benutzen NA als Transmitter und innervieren das Myokard, den Sinus- und AV-Knoten, lokale Ganglien und Koronargefäße (Dalsgaard et al., 1986; Kennedy et al., 1998; Steele und Choate,

1994). In postganglionären Neuronen wurden NPY und NA als Kotransmitter identifiziert (Dalsgaard et al., 1986; Steele und Choate, 1994). Die sympathische Wirkung am Herzen erfolgt überwiegend über β -adrenerge Rezeptoren und ist positiv ino-, chrono-, dromo- und lusitrop (Behrends et al., 2012). Die vaskuläre Regulation erfolgt zusätzlich über α -Rezeptoren, dabei bewirkt eine Stimulation der α_1 -Rezeptoren eine Vasokonstriktion, während über β_2 -Rezeptoren eine Vasodilatation hervorgerufen wird (Behrends et al., 2012).

1.2 Mediatoren und Enzyme des autonomen Nervensystems

1.2.1 Acetylcholin (ACh)

Bereits 1907 stellte Hunt die These auf, dass ACh an der neuronalen Signalübertragung beteiligt ist. 1921 gelang Otto Loewi der Nachweis eines „Vagusstoffes“, der an der Signalübertragung von Nervenimpulsen beteiligt ist, den Henry Dale später als ACh identifizierte. Mittlerweile haben Untersuchungen bestätigt, dass es sich bei ACh um ein sehr altes Molekül handelt, das in Bakterien, Algen, Protozoen und Pflanzen nachgewiesen werden konnte (Wessler et al., 1999). Es ist der Überträgerstoff an allen präganglionären sympathischen sowie an prä- und den meisten postganglionär parasympathischen Nervenendigungen und ist zusätzlich für die Signalübertragung an Synapsen des ZNS und an der motorischen Endplatte verantwortlich (Gotti et al., 1997; Lindstrom et al., 1996). Die ACh-Synthese erfolgt mit Hilfe der ChAT, die im Zytoplasma ACh aus Acetyl-CoA und Cholin synthetisiert (Nachmansohn et al., 1943). Durch den vesikulären Acetylcholintransporter (VACHT) wird ACh im H^+ -Antiport in Vesikel verpackt und so bis zur Freisetzung gespeichert (Matsuura et al., 1997a). Charakteristisch für VACHT ist neben seiner Hemmbarkeit durch Vesamicol (Erickson et al., 1994; Usdin et al., 1995) seine ungewöhnliche Genlage. Es befindet sich zwischen den beiden ersten nicht kodierenden Exons für ChAT, und es gibt Hinweise für eine Ko-Regulation dieser beiden Gene (Oda, 1999; Wu und Hersh, 1994). Den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der neuronalen ACh-Synthese stellt die Aufnahme des Cholins aus dem Extrazellularraum dar. Dies erfolgt durch den hochaffinen Cholintransporter (CHT1), der durch seine Abhängigkeit vom Natriumgradienten und durch seine Hemmbarkeit durch Hemicholinium-3

charakterisiert ist (Okuda et al., 2000). Bislang sind drei Freisetzungsmechanismen des ACh bekannt. 1.) Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt zu einer Verschmelzung der Vesikel mit der präsynaptischen Membran und zur Freisetzung des gespeicherten ACh durch Exozytose. 2.) Die humane Plazenta und das Bronchialepithel besitzen organische Kationentransporter (OCT), durch die ein bidirektionaler ACh-Transport, der vom elektrischen Potential und der Substratkonzentration abhängig ist, erfolgt (Lips et al., 2005a; Wessler und Kirkpatrick, 2001). 3.) Aus dem elektrischen Organ des Zitterrochens konnte ein Protein namens Mediatophor isoliert werden, das ACh durch Bildung einer Pore zwischen Vesikeln und der Plasmamembran oder direkt aus dem Zytoplasma freisetzt (Israël und Dunant, 1998).

ACh bindet an zwei Arten von Rezeptoren. Die ionotropen nikotinischen ACh-Rezeptoren sind für schnelle synaptische Transmission verantwortlich und werden agonistisch von Nikotin erregt. Nach Aktivierung öffnen sie sich für Na^+ - und K^+ -Ionen und die Membran wird depolarisiert. Die G-Protein gekoppelten muskarinischen ACh-Rezeptoren bestehen aus fünf Untertypen: M1 bis M5. In der Lunge vorherrschend sind die Typen M1, M2 und M3 (Barnes, 2004; Gautam et al., 2006; Lukas et al., 1999). Beide Arten von Rezeptoren finden sich auch in der Alveolarregion, dem Teil der Lunge, der nicht von cholinergen Nervenfasern innerviert wird, was vermuten lässt, dass nicht-neuronal synthetisiertes ACh existiert, das an diesen Rezeptoren wirkt (Wessler et al., 1998).

Tatsächlich haben Untersuchungen nachweisen können, dass es in der Lunge nicht-neuronale Zellen gibt, die ACh mit Hilfe von ChAT synthetisieren (Wessler et al., 1998). Es wird davon ausgegangen, dass nicht-neuronaless ACh als parakriner Modulator fungiert und unter anderem wesentlich an der Konstriktion der kleinen Atemwege beteiligt ist (Barnes, 2004; Kummer und Lips, 2006). Es ist an inflammatorischen Prozessen bei chronisch entzündlichen Lungenerkrankungen wie Asthma bronchiale oder COPD beteiligt, führt zum Umbau bronchopulmonaler Wandschichten und reguliert die Zellproliferation im Atemwegsepithel (Barnes, 2004; Klapproth et al., 1997; Kummer und Lips, 2006).

Am Abbau des ACh sind zwei Enzyme beteiligt, die unspezifische Butyrylcholinesterase (BChE) und die spezifische Acetylcholinesterase (AChE) (Darvesh et al., 2003; Dvir et al., 2010; Rosenberry, 1975). Die AChE wird von cholinergen Neuronen synthetisiert, kann sowohl intra- als auch extrazellulär

vorkommen und als lösliches Enzym oder an die Membran gebunden vorliegen (Rosenberry, 1975). Im synaptischen Spalt wird die Wirkung des ACh beendet, indem es durch AChE in Azetat und Cholin gespaltet wird. Das hierdurch entstandene Cholin wird durch hochaffine Transporter wieder in die Nervenendigungen aufgenommen (Rosenberry, 1975). Neuere Studien zeigten, dass beide Esterasen auch von nicht-neuronalen ACh-produzierenden Zellen synthetisiert werden können (Grando et al., 2007).

1.2.2 Protein gene product 9.5 (PGP 9.5)

Das Protein gene product 9.5 (PGP 9.5) ist eine Ubiquitinhydrolase, die in allen Stadien der Gewebsdifferenzierung exprimiert wird (Wilkinson et al., 1989) und ursprünglich als zytoplasmatischer Marker für Neurone und neuronale Zellen aus humanen Gehirnextrakten isoliert wurde (Jackson und Thompson, 1981). Aufgrund seines gehäuft Vorkommens in neuronalem Gewebe galt PGP 9.5 ursprünglich als ein neuronenspezifischer Marker und wurde in diesem Zusammenhang auch als ein sensitiver Marker für neuroendokrine Tumore identifiziert. Mittlerweile konnte das Protein auch in Melanozyten, glatter Muskulatur, Leydigzellen, Merkelzellen und Fibroblasten nachgewiesen werden (Campbell et al., 2003), was die These der neuronalen Spezifität widerlegt. In Untersuchungen der Lunge verschiedener Spezies wurde PGP 9.5 in Axonen, im Zytoplasma neuroepithelialer Körperchen und in lokalen Neuronen dargestellt (Lauweryns und Van Ranst, 1988). Neuroepitheliale Körperchen wurden dabei im respiratorischen Epithel, im gesamten Respirationstrakt und in der Nasenschleimhaut gefunden (Adriaensen und Scheuermann, 1993). Kusindarta et al. gelang es in ihren Untersuchungen, PGP 9.5 in trachealen Nervenfasern, in der Lamina propria, der glatten Muskulatur, der Tunica adventitia und an Blutgefäßen nachzuweisen (Kusindarta et al., 2004).

1.2.3 Vasoaktives intestinales Peptid (VIP)

Das aus 28 Aminosäuren bestehende Polypeptid wurde erstmals als eine vasodilatativ wirkende Substanz aus dem Darm isoliert (Said und Mutt, 1969). In Atemwegen des

Menschen wurden VIP-positive Fasern in der glatten Muskulatur des Respirationstrakts und der Lamina propria, rund um Drüsen und Blutgefäße nachgewiesen, dabei war mit abnehmendem Durchmesser der Atemwege auch eine abnehmende Faserdichte zu beobachten (Baraniuk et al., 1990). VIP ist der stärkste Bronchodilatator mit maximaler Wirkung in den zentralen Atemwegen (Palmer et al., 1986) und führt an Gefäßen der oberen Atemwege sowie an Pulmonalarterien zu einer Vasodilatation (Hamasaki et al., 1983; Lundberg et al., 1981). Auch anti-inflammatorische Effekte des VIP konnten nachgewiesen werden. VIP-Rezeptoren werden von T-Lymphozyten, Mastzellen und Eosinophilen exprimiert, so dass aufgrund dieser Eigenschaften VIP eine wichtige Stellung in pathophysiologischen Prozessen bei chronisch entzündlichen Atemwegserkrankungen einnimmt (Goetzel et al., 1998; Groneberg et al., 2004; Said und Dickman, 2000). In der Nasenschleimhaut und in den Speicheldrüsen von Katzen wurde eine Kolo-kalisation von ACh mit VIP beobachtet (Lundberg et al., 1981), in der Trachea des Frettchens (Dey et al., 1993) und in intrinsischen kardialen Ganglien des Meerschweinchens (Parsons et al., 2006) ein gemeinsames Vorkommen mit NO nachgewiesen. In Studien am Meerschweinchen wurde in nicht-adrenergen sympathischen Neuronen der Trachea ein gemeinsames Vorkommen VIP-immunreaktiver Fasern mit NPY entdeckt (Bowden und Gibbins, 1992). Durch retrogrades Tracing wurde das Ganglion stellatum als Ursprungsort dieser Fasern identifiziert (Bowden und Gibbins, 1992, Kummer et al. 1992). Auch an der kardialen Innervation konnte eine Beteiligung des VIP nachgewiesen werden. Dabei führt es zu einer Vasodilatation und wirkt positiv chronotrop (Groneberg et al., 2004; Hoover, 1989; Richardson et al., 2003; Weihe et al., 1984).

1.2.4 Neuropeptid Tyrosin (NPY)

1982 gelang es Tatemoto et al. aus Extrakten von Schweinegehirnen ein aus 36 Aminosäuren bestehendes Peptid zu isolieren (Tatemoto et al., 1982). Zusammen mit Polypeptid YY und dem Pankreatischen Polypeptid (PP) gehört NPY zur Familie der Pankreatischen Polypeptide, für die das Vorhandensein von Tyrosin am N- und C-terminalen Ende charakteristisch ist (Larhammar, 1996; Tatemoto et al., 1982). NPY-immunreaktive Fasern konnten im gesamten Respirationstrakt des Menschen, des Meerschweinchens und der Ratte nachgewiesen werden (Lundberg et al., 1983a;

Sheppard et al., 1984), sowie in submukösen Drüsen, in der glatten Muskulatur und um Blutgefäße (Uddman et al., 1984). Auch in Zellkörpern des Ganglion stellatum und des Ganglion cervicale superius, sowie in lokalen Ganglienzellen der Trachea wurde eine Immunreaktion für NPY beschrieben (Matran, 1991). Im peripheren Nervensystem wird NPY als Kotransmitter zu NA aus Fasern postganglionärer Sympathikusneurone ausgeschüttet, wo es im Gegensatz zu NA nur in großen Vesikeln gespeichert wird (Järvi et al., 1986; Lundberg et al., 1990; Pelletier et al., 1984). In seiner Rolle als Kotransmitter zu NA führt NPY zu dessen Wirkungsverstärkung und reguliert über präsynaptische NPY2-Rezeptoren auf postsynaptischen sympathischen Nervenendigungen neben seiner eigenen Ausschüttung auch die von NA und ATP (Lundberg et al., 1986; Potter, 1987; Stjärne et al., 1986). Auch kann NPY die Transmitterausschüttung aus sensiblen Nervenendigungen des Respirationstraktes und der Trachea und aus parasympathischen Nervenendigungen am Herzen regulieren (Grundemar et al., 1988; Matran et al., 1989; Potter, 1987). Weiterhin konnte eine Kolokalisation von NPY und ACh in Atemwegsganglien der Ratte (Kusindarta et al., 2004) sowie von NPY und VIP in nicht-noradrenergen sympathischen Fasern der Trachealmuskulatur nachgewiesen werden (Bowden und Gibbins, 1992). Durch retrograde Tracingstudien konnte als Ursprung NPY/VIP+/+- immunreaktiver Fasern das Ganglion stellatum identifiziert werden (Bowden und Gibbins, 1992). Ebenfalls konnten retrograde Tracinguntersuchungen am Meerschweinchen ein gemeinsames Vorkommen von NPY und TH in Atemwegsneuronen sympathischer Ganglien nachweisen. Diese Fasern haben ihren Ursprung im Ganglion cervicale superius, im Ganglion stellatum und in Ganglien des thorakalen sympathischen Grenzstrangs. Sie innervieren Lunge und Trachea und bewirken eine Relaxation der glatten Muskulatur (Kummer et al., 1992a). NPY-positive postganglionär sympathische Fasern, die an der kardialen Innervation beteiligt sind, haben ihren Ursprung in zervikothorakalen Grenzstrangganglien. In Untersuchungen an der Ratte konnte NPY zusätzlich in parasympathischen Neuronen intrinsischer kardialer Ganglien nachgewiesen werden (Richardson et al., 2003). An Koronargefäßen ist NPY ein starker Vasokonstriktor. Die Vasokonstriktion setzt dabei subakut ein, ist jedoch stärker und langanhaltend (Lundberg und Tatemoto, 1982).

1.2.5 Tyrosinhydroxylase (TH)

Bei der Tyrosinhydroxylase handelt es sich um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Katecholaminbiosynthese. Katecholamine werden in Vesikeln im Nebennierenmark und in sympathischen Neuronen gespeichert. Ihre Biosynthese geht von der Aminosäure Tyrosin aus, aus der mit Hilfe von TH, die zu den Biotpterin-abhängigen Aminosäure-Monooxygenasen gezählt wird, zunächst L-Dopa entsteht. L-Dopa wird durch die Dopa-Decarboxylase zu Dopamin hydroxyliert, woraus nach Einfügen einer Hydroxylgruppe durch Dopamin- β -Hydroxylase NA entsteht. In einem letzten Schritt kann durch eine N-Methyltransferase eine Methylgruppe übertragen und so Adrenalin gebildet werden (Püschel et al., 2011).

Am Meerschweinchen konnte TH in Nervenfasern um Blutgefäße, in der glatten Muskulatur der Trachea und Bronchien und vereinzelt in der Lamina propria nachgewiesen werden. In Atemwegsneuronen sympathischer Ganglien ließ sich auch eine Kolo-kalisation mit NPY beobachten. Als Ursprungsort wurde dabei durch retrograde Tracingstudien das Ganglion stellatum, das Ganglion cervicale superius sowie Ganglien des thorakalen sympathischen Grenzstrangs identifiziert (Kummer et al., 1992a).

1.2.6 Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP)

Es gibt zwei Isoformen (Amara et al., 1985; Steenbergh et al., 1985). Das aus 37 Aminosäuren bestehende α -CGRP ist auf dem Präprocalcitonin-Gen kodiert, welches auf Chromosom 11 lokalisiert ist (Emeson et al., 1989; Kittur et al., 1985). Interessanterweise stammen α -CGRP, welches aus sensorischen Neuronen freigesetzt wird, und β -CGRP, das überwiegend im enterischen Nervensystem beobachtet wurde, von verschiedenen Genen ab und unterscheiden sich durch drei Aminosäuren beim Menschen und durch eine Aminosäure bei der Ratte (Amara et al., 1985; Kajekar und Myers, 2008). Die Notwendigkeit und die genaue Rolle der α - und β -Isoform ist jedoch bislang noch nicht hinreichend geklärt. Das Neuropeptid konnte erstmals aus C-Zellen der Schilddrüse und aus Neuronen der Spinalganglien isoliert werden (Morris et al., 1984; Rosenfeld et al., 1983) und wurde mittlerweile auch im Herzen, in der

Hypophyse, in Blutgefäßen, in der Lunge und im gastrointestinalen Trakt nachgewiesen (Ghatta und Nimmagadda, 2004). Es wird aus sensorischen Nervenfasern freigesetzt, von denen einige auch SP und Neurokinine enthalten (Kajekar und Myers, 2008; Martling et al., 1988). Untersuchungen mittels in situ Hybridisierung und Immunhistochemie konnten das Vorkommen von CGRP-immunreaktiven Nervenfasern und neuroendokrinen Zellen in der Lunge nachweisen, wo es neben einer Bronchokonstriktion auch eine Dilatation der Pulmonalarterien und –venen hervorruft und eine Mastzelldegranulation und Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren bewirkt (Berger, 2000; Ghatta und Nimmagadda, 2004; Keith et al., 1991). Aufgrund dieser Eigenschaften ist CGRP im Rahmen pathophysiologischer Prozesse pulmonaler Erkrankungen wie Asthma bronchiale, COPD oder pulmonale Hypertonie von Bedeutung.

Am Herzen bilden CGRP-positive Nervenfasern Netzwerke um Blutgefäße und bewirken eine Vasodilatation (Franco-Cereceda et al., 1988; Ghatta und Nimmagadda, 2004). Auch das Reizleitungssystem und die kardiale Muskulatur enthalten CGRP-immunreaktive Fasern, durch die eine positiv chrono- und inotrope Wirkung hervorgerufen wird (Franco-Cereceda et al., 1988; Ghatta und Nimmagadda, 2004). In Studien an der Ratte konnte beobachtet werden, dass durch NO sensorische Nervenfasern aktiviert werden, um CGRP freizusetzen (Booth et al., 2000). Vor diesem Hintergrund ist die Rolle des CGRP als potenter Vasodilator in Verbindung mit kardioprotektiven Eigenschaften des NO bei kardialen Erkrankungen wie Herzinsuffizienz oder Myokardinfarkt interessant.

1.2.7 Substanz P (SP)

Die zur Familie der Tachykinine gehörende SP wurde erstmals 1931 entdeckt, ihre Aminosäuresequenz jedoch erst 1971 vollständig entschlüsselt (Chang et al., 1971; von Euler und Gaddum, 1931). Alle Tachykinine sind durch die gleiche Aminosäuresequenz am C-terminalen Ende charakterisiert (Maggio und Hunter, 1984). Das am längsten bekannte Tachykinin ist SP, nachfolgend konnten jedoch weitere Tachykinine wie Neurokinin A (NKA), Neurokinin B (NKB), Neuropeptid K (NPK) und Neuropeptid γ identifiziert werden (Harmar et al., 1990; Kotani et al., 1986; Tatemoto et al., 1985a). Mit Hilfe immunhistochemischer Verfahren ist es gelungen, SP und NKA in

unmyelinisierten sensiblen C-Fasern der unteren Atemwege, insbesondere im Bronchialepithel, um tracheale und bronchiale Blutgefäße, in der glatten Muskulatur der Trachea und Bronchien, in der Lamina propria und in tracheobronchialen parasympathischen Ganglienzellen des Menschen, des Meerschweinchens, der Ratte und der Maus nachzuweisen (Hua et al., 1985; Lundberg et al., 1984a; Uddman und Sundler, 1987). Einige dieser Fasern waren gleichzeitig immunreaktiv für CGRP (Lundberg et al., 1984a). Durch Einsatz retrograden Tracings konnten als Ursprung dieser Fasern die sensiblen Vagusganglien, vor allem das Ganglion jugulare, und die oberen thorakalen Spinalganglien, identifiziert werden (Dinh et al., 2005, 2006a; Kollarik et al., 2003, Kummer et al., 1992). Derzeit sind vier Subtypen von Tachykininrezeptoren bekannt (NK1-NK4), über die Tachykinine ihre Wirkung entfalten (Canning et al., 1998a; Donaldson et al., 1996; Helke et al., 1990). Ihr Vorkommen wurde sowohl im respiratorischen Epithel als auch in der Muskulatur der Bronchien und Trachea, in Drüsen und in intrinsischen Ganglien des Meerschweinchens nachgewiesen. Über den NK 1-Rezeptor führt SP zur Konstriktion vor allem der kleinen Bronchien, während an den größeren die cholinerge Wirkung dominiert (Frossard und Barnes, 1991; Joos, 2001). Zusätzlich bewirkt SP eine Steigerung der Mukosekretion, eine Vasodilation sowie eine verstärkte Plasmaexsudation (Kuo et al., 1992; Lundberg et al., 1983b; Rogers et al., 1989; Saria et al., 1983). In Anbetracht dieser Eigenschaften ist SP für die Pathogenese inflammatorischer Lungenerkrankungen wie Asthma bronchiale oder COPD von Bedeutung.

Die an der kardialen Innervation beteiligten SP-immunreaktiven Fasern entspringen aus spinalen und vagalen Ganglien und üben je nach Rezeptortyp unterschiedliche Wirkungen aus (Dalsgaard et al., 1986; Pernow, 1983; Reinecke et al., 1980). Während über den NK 1-Rezeptor eine Vasodilatation erfolgt, bewirkt SP am NK 2-Rezeptor eine Vasokonstriktion sowie eine positive Ino- und negative Chronotropie (Chang et al., 2000). Die Wirkung der Tachykinine wird beendet, indem sie durch das Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) und die neurale Endopeptidase (NEP) durch enzymatische Spaltung abgebaut werden (Di Maria et al., 1998; Welches et al., 1993a; Yokosawa et al., 1985).

1.2.8 Stickstoffmonoxid (NO)

Furchgott beschrieb 1980 einen Faktor, der von Endothelzellen abgegeben wurde und eine Vasodilatation herbeiführte. Diese damals als endothelium-derived relaxing factor (EDRF) bezeichnete Substanz ist heute als NO bekannt (Furchgott und Zawadzki, 1980; Palmer et al., 1987b). Dabei handelt es sich um ein gasförmiges Molekül, welches nicht gespeichert, sondern im Bedarfsfall synthetisiert wird und ubiquitär im menschlichen Körper vorkommt (Bredt und Snyder, 1990). Aus der Aminosäure L-Arginin entsteht NO durch die NO-Synthase (NOS) mit Hilfe von NADPH, über die Zwischenprodukte Argininhydroxid und Citrullin. (Mayer et al., 1989; Moncada et al., 1989). NOS liegt in drei Isoformen vor, wobei jede durch ein eigenes Gen kodiert wird:

1. Neuronale NOS (nNOS oder NOS 1), welche mit Hilfe der Immunhistochemie und NADPH-Diaphorasetechnik vorwiegend im Nervensystem und im Respirationstrakt von Menschen, Meerschweinchen, Ratte und Frettchen nachgewiesen wurde (Bredt et al., 1990; Dey et al., 1993; Fischer und Hoffmann, 1996; Fischer et al., 1993a). Der Ursprung der die Atemwege innervierenden NOS-immunreaktiven Fasern konnte durch retrogrades Tracing am Meerschweinchen in Zellkörpern des Ganglion jugulare und Ganglion nodosum sowie in parasymphatischen, intrinsischen Ganglien in Trachea und Bronchien gezeigt werden (Fischer und Hoffmann, 1996).
2. Induzierbare NOS (iNOS oder NOS 2), die sowohl im vaskulären Endothel, dem respiratorischen Epithel und der glatten Gefäß- und Atemwegsmuskulatur, im kardiovaskulären System als auch in Alveolarmakrophagen und eosinophilen Granulozyten vorkommt (Born et al., 2002; Saleh et al., 1997) und während entzündlicher Prozesse wie z. B. Asthma bronchiale vermehrt exprimiert wird.
3. Endotheliale NOS (eNOS oder NOS 3), welche in Endothelzellen der Lungengefäße exprimiert wird und hier eine Vasodilatation sowie eine Hemmung der Thrombozytenaggregation bewirkt (Freedman und Keaney, 1999; Freedman et al., 1999).

Während die Bildung von nNOS und eNOS durch das kalziumabhängige Calmodulin moduliert wird, ist die Bildung von iNOS kalziumunabhängig (Bredt et al., 1990). Alle drei NOS-Isoformen können auch im Herzen am Endokard, in Endothelzellen der

Koronararterien, den Kardiomyozyten und den Nervenfasern nachgewiesen werden (Brady et al., 1993; Hassall et al., 1992; Manso et al., 2000; Smith et al., 1991, 1996). Hier bewirkt das freigesetzte NO eine Vasodilation und hat einen negativ inotropen Effekt auf die kardiale Muskulatur, was therapeutisch zur Blutdruck- und Nachlastsenkung bei ischämischen Herzerkrankungen und hypertensiven Entgleisungen eingesetzt wird. Aufgrund obengenannter Eigenschaften kann NO im bronchopulmonalen System eine pro-inflammatorische Wirkung zugeschrieben werden, so dass die Regulation der NOS bei entzündlichen Lungenerkrankungen wie Asthma bronchiale und COPD von besonderer Bedeutung ist (Ricciardolo et al., 2006).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

ACh nimmt als stärkster Bronchokonstriktor in der Innervation des Respirationstraktes eine wichtige Stellung ein. Barnes stellte jedoch in seinen Studien 2004 die Hypothese auf, dass die kleinsten Atemwege nicht cholinerg innerviert seien (Barnes 2004). Diese Aussage war ausschlaggebend für die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit und das besondere Interesse an dieser Faserklasse.

Folgende Fragen sollten geklärt werden:

Wie verteilen sich cholinerge Fasern entlang den unterschiedlichen Abschnitten des bronchopulmonalen Systems?

Gibt es Kotransmitter zu ACh, und wenn ja, welche der untersuchten Substanzen gehören dazu, und in welchen Abschnitten des Respirationstraktes kommen sie vor?

Ergibt sich anhand vorliegender Ergebnisse ein Hinweis auf das Vorhandensein von NANC-Neuronen im bronchopulmonalen System?

Hierzu wurde durch Anwendung der AChE-Enzymhistochemie und eines fluoreszierenden Antikörpers gegen das glattemuskuläre α -Aktin zunächst die Innervationsdichte der Atemwegsmuskulatur in verschiedenen Abschnitten des bronchopulmonalen Systems dargestellt und quantitativ erfasst. Zusätzlich wurde die cholinerge Innervation des Respirationstraktes dargestellt und Kotransmitter zu ACh mittels Doppelimmunfluoreszenz identifiziert. Hierfür erfolgte nach Darstellung einer Gesamtinnervation der Brustraumorgane durch Einsatz eines Antikörpers gegen das

neuronale Proteins PGP 9.5 die Anwendung von Immunhistochemie und Fluoreszenzmarkierungen mit Antikörpern gegen den vesikulären Acetylcholintransporter (VACHT), den Neuropeptiden NPY, VIP, CGRP und SP sowie dem Enzym Tyrosinhydroxylase (TH). Dadurch sollte geklärt werden, in wie weit die sogenannten NANC-Mediatoren eigenständig in Nervenfasern vorkommen oder als Kotransmitter cholinergischer Neurone freigesetzt werden. Zur Vervollständigung der Studie wurde zusätzlich die NOS mittels NADPH-Diaphorase-Reaktion dargestellt. Ergänzend zum Respirationstrakt wurde auch die cholinerge Innervation des Ösophagus und des Herzens untersucht, wobei hier keine quantitative Analyse erfolgte.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Gewebeaufbereitung

Für die hier vorliegende Arbeit wurden fünf C57Bl6-Mäuse (ZTL, JLU Giessen) beider Geschlechter in einer geschlossenen Kammer durch Inhalation von Isofluran (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) getötet (RPNr. GI 20/23-Nr. A5/2010). Die Thoraxpakete - bestehend aus Herz, Lunge, Ösophagus, Trachea, Thymus und Gefäßen - wurden sofort entnommen und in 4% Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer für 6 h immersionsfixiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die überschüssige Fixationslösung mehrmals mit 0,1 M Phosphatpuffer ausgewaschen und die Thoraxpakete zur Kryokonservation für 24 Stunden in 18% Saccharoselösung in 0,1 M Phosphatpuffer überführt. Anschließend wurde das Gewebe mittels Tissue-Tek (Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande) auf Filterpapier fixiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Für die nachfolgenden Versuchsreihen wurden von dem so präparierten Gewebe am Kryostaten (Leica CM 1900, Bensheim, Deutschland) 10 µm dünne Gefrierschnitte angefertigt, auf gelatinierte Objektträger aufgezogen und für eine Stunde bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Weitere verwendete Geräte und Materialien siehe Tab. 1.

<u>Geräte/Materialien</u>	<u>Typ/Hersteller</u>
Kryostat	Leica CM 1900, Leitz (Bensheim, Deutschland)
Analysewaage	Scaltec SBA 53, ORION (Heiligenstadt, Deutschland)
Rührgerät	IKA RCT basic, safety control (Staufen, Deutschland)
pH-Meter	ORION model 410 A (Boston, USA)
Wärmeschrank	Typ B 5042, Heraeus (Hanau, Deutschland)
Fluoreszenz- und Hellfeldmikroskop	Axioplan 2ee imaging, Carl Zeiss GmbH (Göttingen, Deutschland)
Deckgläschen	R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)

Tab. 1 Verwendete Geräte und Materialien

2.2 AChE-Histochemie kombiniert mit α -smooth-muscle-actin (α -SMA)-Immunfluoreszenz

Die luftgetrockneten 10 μ m dünnen Schnitte wurden zunächst viermal jeweils zehn Minuten lang in PBS und anschließend zweimal fünf Minuten lang im 0,05 M Natriumacetatpuffer (pH 5,2) gewaschen. Im nächsten Schritt wurde eine Färbelösung aus 10 ml Lösung A, 100 μ l Lösung B und 100 μ l Lösung C (Zusammensetzung der Lösungen siehe unten) hergestellt. Die Schnitte wurden mit der Färbelösung bedeckt und in einer feuchten Kammer bei 37°C zwei Stunden inkubiert. Der Färbeprozess wurde nach Ablauf der vorgegebenen Zeit mit zehnminütigem Waschen in Aqua dest. gestoppt. Anschließend folgte erneutes Waschen in PBS für zweimal fünf Minuten.

Im nächsten Schritt folgte eine einstündige Inkubation mit aus 5% Rinderserumalbumin und 5% normalem Ziegenserum bestehender Blocklösung, gelöst in PBS. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Blocklösung abgesaugt und mit PBS+S auf eine Konzentration von 1:400 verdünnter FITC-konjugierter- α -smooth-muscle-actin-Antikörper (Tab. 2) auf die Schnitte aufgetragen. Die Inkubation in der feuchten Kammer erfolgte im Dunkeln und dauerte eine Stunde. Im Anschluss wurde der Antikörper abgesaugt, die Schnitte zweimal zehn Minuten lang in PBS gewaschen und mit gepuffertem Glycerol, pH 8,6, eingedeckt.

Zur Auswertung diente ein Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioplan 2 imaging, Göttingen, Deutschland) mit den in Tab.3 beschriebenen Filtern für die FITC-Darstellung.

2.2.1 Antikörper

<u>Antigen</u>	<u>Konjugat</u>	<u>Lot-Nummer</u>	<u>Spezies</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
α -smooth-muscle actin	FITC	125K4774	Maus, monoclonal Klon 1A4	1:500	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA

Tab. 2 Verwendeter Primärantikörper im Rahmen der AChE-Immunhistochemie

2.2.2 Verwendete Lösungen

Stammlösung A:

400 ml Aqua dest.

5 ml Triton X 100 (Serva, Heidelberg, Deutschland)

1,64 g Natriumacetat (CH_3COONa) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

0,068 ml Eisessig (Merck, Darmstadt, Deutschland)

0,734 g Natriumcitrat ($\text{C}_5\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$) x $2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Deutschland)

0,253 g Kupfersulfat (CuSO_4) (zuvor in 20 ml Aqua dest. lösen) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

0,0855 g iso-OMPA (Tetra(monoisopropyl)pyrophosphortetramid, $\text{C}_{12}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_3\text{P}_2$, Molekulargewicht 342,36) (Sigma, Seelze, Deutschland)

ad 500 ml Aqua dest., pH-Wert mit Essigsäure auf 5,3-5,4 einstellen; bei $+4^\circ\text{C}$ ein Jahr haltbar

Stammlösung B:

0,05 g Acetylthiocholineiodid (AppliChem, BioChemica, Darmstadt, Deutschland)
gelöst in 1 ml Aqua dest.; bei $+4^\circ\text{C}$ einen Monat haltbar

Stammlösung C:

Gesättigtes $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (33% Kaliumferricyanid) (AppliChem, BioChemica, Darmstadt, Deutschland) in Aqua dest.; bei $+4^\circ\text{C}$ eine Woche haltbar

Die Färbelösung für die AChE-Histochemie wird hergestellt aus 10 ml Stammlösung A, 100 μl Stammlösung B und 100 μl Stammlösung C.

2.3 Auswertung

Unter dem Mikroskop wurden die Schnitte aller fünf Versuchstiere in unterschiedlichen, zufällig ausgewählten Ebenen in derselben Vergrößerung mit dem Hellfeldmikroskop betrachtet, die Bronchi und Bronchioli fotografiert und deren Durchmesser mithilfe eines Computerprogramms (Axio Vision, Zeiss, Jena, Deutschland) vermessen. Mit dem Fluoreszenzmikroskop erfolgte die Begutachtung des FITC-markierten Antikörpers und auf diese Weise die Darstellung der Atemwegsmuskulatur mit nachfolgender Flächenberechnung mittels Axio Vision. Im nächsten Schritt wurde die Innervationsdichte der Bronchi und Bronchioli mit cholinergen Fasern berechnet. Hierfür wurde das Bildbearbeitungsprogramm Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) verwendet, womit die Vermessung der Länge der einzelnen Fasern sowie die Vermessung der Muskelfläche möglich war. Im Anschluss erfolgte die Division der einzelnen Faserlängen durch die Muskelfläche. Diese Werte wurden für drei Größenklassen von Bronchi separat erhoben: 1) Durchmesser <100 µm, 2) Durchmesser zwischen 100 und 200 µm, 3) Durchmesser >200 µm. Die daraus resultierenden Ergebnisse wurden mit SPSS (SPSS Inc., München, Deutschland) in Boxplotdiagrammen visualisiert und unter Verwendung des nicht-parametrischen Friedman-Tests ausgewertet und, falls $p < 0,05$ in diesem Test erreicht wurde, nachfolgend mit dem Wilcoxon-Test im paarweisen Vergleich ausgewertet.

2.4 Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Untersuchung wurden die luftgetrockneten Gewebeschnitte zunächst für eine Stunde mit der Blocklösung (siehe Abschnitt 2.2.2) in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Blocklösung sättigt unspezifische Proteinbindungsstellen und bewirkt durch das in ihr enthaltene Detergenz Tween 20 eine Permeabilisierung der Membranen. Dies verbessert die Penetration des Antikörpers in die Zelle. Nach einer Stunde wurde die Blocklösung abgesaugt, die Primärantikörper (Tab. 4), verdünnt mit PBS+S (siehe Abschnitt 2.2.2), aufgetragen und über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper abgesaugt, die Schnitte zweimal für jeweils zehn Minuten in PBS gewaschen und für eine Stunde mit einem Sekundärantikörper gegen Immunglobuline von Ziege und einem

weiteren Sekundärantikörper (Tab. 5) im Dunkeln inkubiert. Die Sekundärantikörper sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert und markieren den Primärantikörper. Im letzten Schritt wurden die Schnitte nach Ablauf der Inkubationszeit erneut zweimal in PBS gewaschen und anschließend mit carbonatgepuffertem Glycerol (pH 8,6) eingedeckt.

Zur Auswertung diente ein Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioplan 2 imaging, Göttingen, Deutschland) mit den in Tab. 3 charakterisierten Filtern:

<u>Fluorochrome</u>	<u>Erregerfilter</u>	<u>Sperrfilter</u>
FITC	BP 450-492 nm	BP 515-550 nm
Cy3	BP 525-560 nm	BP 570-650 nm

Tab. 3 Charakteristika der Filter für die Fluoreszenzmikroskopie

FITC = Fluoresceinisothiocyanat, Cy3 = Carbocyanin 3, BP= Bandpass

2.4.1 Antikörper

<u>Antigen</u>	<u>Konjugat</u>	<u>Lot-Nummer</u>	<u>Spezies</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Kaninchen-IgG	FITC	74737	Esel	1:100	Dianova, Hamburg Jackson ImmunoResearch, Laboratories Inc., West Grove, PA, USA
Ziege-IgG	Cy3	0602023492	Esel	1:800	Chemicon International Inc., Temecula CA, USA

Tab. 4 Verwendete Sekundärantikörper

<u>Antigen</u>	<u>Lot-Nummer</u>	<u>Wirtsspezies</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Protein Gene Product 9.5	23040251	Kaninchen	1:400	Biotrend Chemikalien GmbH Köln, Deutschland
Vasoaktives intestinales Polypeptid	VIP-Y010	Kaninchen	1:2000	Prof. Yanahaira, Shizuoka, Japan
Neuropeptid Y	N 9528	Kaninchen	1:2500	Sigma Saint Louis, Missouri, USA
Tyrosinhydroxylase	Z05094	Kaninchen	1:100	Biotrend Chemikalien GmbH Köln, Deutschland
Calcitonin Gene-Related Peptide	040826-4	Kaninchen	1:3200	Peninsula Laboratories Inc., San Carlos, USA
Substanz P	0606031672	Kaninchen	1:800	Chemicon International Inc., Temecula CA, USA
Vesikulärer Acetylcholin- Transporter	BT 1007	Ziege	1:4000	Biotrend Chemikalien GmbH Köln, Deutschland

Tab. 5 Verwendete Primärantikörper im Rahmen der Doppelimmunfluoreszenz

2.4.2 Verwendete Lösungen

Blocklösung:

10% normales Schweineserum (Schlachthof, Giessen, Deutschland)

0,5% Tween 20 (Sigma, Seelze, Deutschland)

0,1% bovines Serumalbumin in PBS (Sigma, Seelze, Deutschland)

PBS (Phosphate-buffered saline):

28,75 ml 0,2 M NaH_2PO_4 (31,2 g /l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; Merck, Darmstadt, Deutschland)

96,2 ml 0,2 M Na_2PO_4 (17,8 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; Fluka, BioChemica, Steinheim, Deutschland)

22,4 g NaCl 0,48%

ad 5 l Aqua dest.

PBS+S:

PBS mit doppelter Menge NaCl

Carbonatgepuffertes Glycerol:

Carbonatpuffer (0,5 M NaHCO_3 mit 0,5 M Na_2CO_3 , pH 8,6) gemischt mit Glycerol (Merck, Darmstadt, Deutschland) im Verhältnis 1:2

Phosphatpuffer 0,1 M (pH 7,4):

230 ml 0,1 M NaH_2PO_4 (Merck, Darmstadt, Deutschland)

770 ml 0,1 M Na_2PO_4 (Fluka, BioChemica, Steinheim, Deutschland)

Fixationslösung (pH 7,4):

40 g Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland)

0,5 l Aqua dest.

einige Tropfen 2 M NaOH, bis zum Aufklaren der Lösung

0,5 l Phosphatpuffer (0,2M)

Objektträgerbeschichtung:

0,5 g Chromalaun (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 5 g Gelatine (AppliChem, BioChemica, Darmstadt, Deutschland) in Aqua dest. auf 40° C erwärmen und auflösen. Auf Raumtemperatur abkühlen lassen.

Lösung filtrieren und autoklavierte Objektträger für 10 Minuten eintauchen. Bei 37°C über Nacht trocknen lassen.

2.5 NADPH-Diaphorase-Reaktion

Der Aktivitätsnachweis der NOS erfolgt mittels NADPH-Diaphorase-Histochemie. Hierfür werden 10 µm dünne Gefrierschnitte für ca. zwei Minuten in 0,1 M Phosphatpuffer gestellt und anschließend mit der unten aufgeführten Reaktionslösung bedeckt. Nach einer 60-minütigen Inkubation bei 37° C wurden die Schnitte drei mal jeweils fünf Minuten im Phosphatpuffer gewaschen und mit gepuffertem Glycerol eingedeckt.

Reaktionslösung:

0,3 mg/ml Nitroblue Tetrazolium (Biomol, Hamburg, Deutschland) mit 3 mg/ml NADPH (Biomol, Hamburg, Deutschland) mischen und als letztes 9 µl 0,3% Triton X-100 (Serva, Heidelberg, Deutschland) dazugeben, in 299 µl 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) lösen und sofort verwenden.

3. Ergebnisse

Die aufbereiteten Gewebe wurden mikroskopisch auf die Verteilung und Häufigkeit des jeweiligen Fasertyps untersucht. Die Ergebnisse wurden tabellarisch zusammengefasst und geben einen Durchschnitt wieder.

3.1 Histochemische Darstellung der Acetylcholinesterase-Aktivität

Durch Anwendung der AChE-Enzymhistochemie konnten cholinerge Fasern und unter zusätzlichem Einsatz des Antikörpers gegen α -smooth-muscle-actin die innervierte glatte Muskulatur der Bronchien und Bronchioli dargestellt werden. Daraus resultierte die Berechnung der Innervationsdichte. Die Bronchien wurden in drei Klassen unterteilt: unter 100 μm , zwischen 100 μm und 200 μm und über 200 μm im Durchmesser. Die Auswertung erfolgte nach dem im Kapitel 2.3 beschriebenen Schema. Hierbei zeigte sich, dass Bronchien mit einem Durchmesser von unter 100 μm gegenüber Bronchien mit einem Durchmesser von über 200 μm signifikant dichter innerviert waren (Abb. 1).

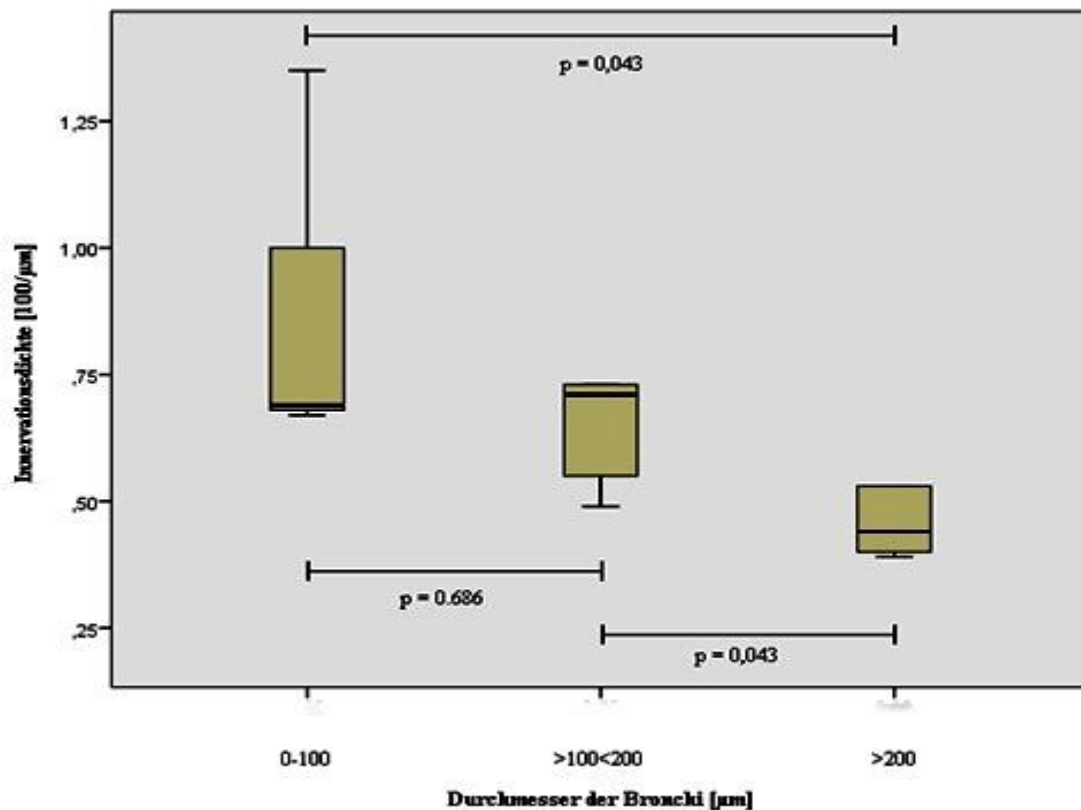


Abb.1: Quantitative Analyse der AChE-Histochemie. Darstellung der Innervationsdichte der Atemwegsmuskulatur durch cholinerge Nervenfasern in Abhängigkeit der Bronchusgröße. Durch Boxplotdiagramme werden die Quartile 0-100 bei N=5 Tieren dargestellt. P-Werte wurden mithilfe des Wilcoxon-Rangsummentests nach vorausgegangenem globalen Friedman-Test ermittelt.

3.2. Doppelmarkierung von VAcHT und PGP 9.5

3.2.1 Trachea, Lunge und Pulmonalgefäße

VAcHT/PGP 9.5 +/- Fasern

Im respiratorischen Epithel von Trachea, Bronchien und Bronchioli konnte dieser Fasertyp nicht nachgewiesen werden. In der Lamina propria der Trachea und Bronchien hingegen zeigten sich wenige immunreaktive Fasern auf (Abb. 2, Abb. 3). Die glatte Muskulatur sowohl in der Trachea als auch in den Bronchien wies zahlreiche VAcHT/PGP 9.5 +/- Fasern (Abb. 2, Abb. 3, Abb. 4, Abb. 5) und die Innervationsdichte nahm im Vergleich zur Lamina propria deutlich zu. In der Alveolarregion konnten keine immunreaktiven Fasern nachgewiesen werden. Die intra-

und extrapulmonalen Arterien wurden von VACHT/ PGP 9.5 +/+ Fasern hauptsächlich im extrapulmonalen und nur vereinzelt im intrapulmonalen Teil innerviert (Abb. 8, Abb. 9). Im Gegensatz dazu konnte eine ubiquitäre Innervation der mit Kardiomyozyten umgebenen Abschnitte der Pulmonalvenen nachgewiesen werden (Abb. 10, Abb. 11), wobei die extrapulmonalen Venen stärker als die intrapulmonalen innerviert waren (Abb. 10).

VACHT/PGP 9.5 +/- Fasern

Dieser Fasertyp wurde in keinem der untersuchten Abschnitte nachgewiesen.

VACHT/PGP 9.5 -/+ Fasern

Die Lamina propria und die glatte Muskulatur von Trachea und Bronchien zeigten wenige VACHT/PGP 9.5 -/+ positive Fasern (Abb. 2, Abb. 3, Abb. 4, Abb. 5). Auch im respiratorischen Epithel wurde dieser Fasertyp nicht nachgewiesen. Die pulmonalen Venen und Arterien wurden von VACHT/PGP 9.5-/+ Fasern innerviert, zeigten aber intra- und extrapulmonal eine geringe Innervationsdichte (Abb. 8, Abb. 9, Abb. 10, Abb. 11). In der Alveolarregion wurden einzelne immunreaktive Fasern nachgewiesen (Abb. 7). Die Pleura wurde vereinzelt durch PGP 9.5-immunreaktive Fasern innerviert (Abb. 6).

3.2.2 Herz, Koronararterien und Ösophagus

VACHT/PGP 9.5 +/+ Fasern

In der kardialen Muskulatur konnte sowohl im Epikard, als auch im Myo- und Endokard vereinzelt eine Innervation durch VACHT/PGP 9.5 +/+ Fasern dargestellt werden (Abb. 12, Abb. 13, Abb. 14). Auch die Koronararterien zeigten wenige positive Fasern (Abb. 15). Im Ösophagus war die Tunica muscularis stärker innerviert als die Lamina propria und die Tunica muscularis mucosae (Abb. 16).

VACHT/PGP 9.5 +/- Fasern

In allen kardialen Schichten lies sich eine Innervation durch PGP 9.5-positive Fasern nachweisen (Abb. 12, Abb. 13, Abb. 14), wobei das Epikard insgesamt eine höhere Innervationsdichte als das Myo- und Endokard aufwies (Abb. 14). Ebenso wurden die Koronararterien ähnlich intensiv wie das Epikard innerviert (Abb. 15). Im Ösophagus zeigte sich eine ähnliche Innervationsdichte in der Lamina propria und der Lamina muscularis, die Lamina muscularis mucosae wurde etwas schwächer innerviert (Abb. 16).

3.2.3 Parasympathische Ganglien

In den parasympathischen Ganglien konnten immunreaktive Zellkörper und Fasern nachgewiesen werden (Abb. 17). Für VACHT wurde eine deutlich schwächere Immunreaktion in den Zellkörpern und Fasern beobachtet als für PGP 9.5 allein. Fasern oder Zellkörper, die nur immunreaktiv für VACHT waren, wurden nicht nachgewiesen.

	VAcHT/PGP 9.5 +/+	VAcHT/ PGP 9.5 +/-	VAcHT /PGP 9.5 -/+
Trachea			
- Epithel	-	-	-
- Lamina propria	+	-	+
- Glatter Muskel	+++	-	+
Lunge			
<u>Bronchi</u>			
- Epithel	-	-	-
- Lamina propria	+	-	+
- Glatter Muskel	+++	-	+
<u>Bronchioli</u>			
- Epithel	-	-	-
- Glatter Muskel	++	-	+
Alveolarregion	-	-	+
Pleura	-	-	+
<u>Pulmonalarterien</u>			
- Extrapulmonal	+	-	+
- Intrapulmonal	(+)	-	+
- Intraazinär	-	-	-
<u>Pulmonalvenen</u>			
- Extrapulmonal	+++	-	+
- Intrapulmonal	++	-	+
Herz			
- Epikard	++	-	++
- Myokard	++	-	+
- Endokard	+	-	+
- Koronararterien	+	-	++
Ösophagus			
- Lamina propria	+	-	++
- Lamina muscularis mucosae	+	-	+
- Tunica muscularis	++	-	++
Ganglien			
- Zellkörper	++	-	-
- Nervenfasern	+	-	+

Tab. 6 Innervationsdichte von VAcHT und PGP 9.5

+++ dichte Innervation; ++ weniger dichte Innervation; + geringe Innervation; (+) vereinzelte Innervation;
- keine Innervation

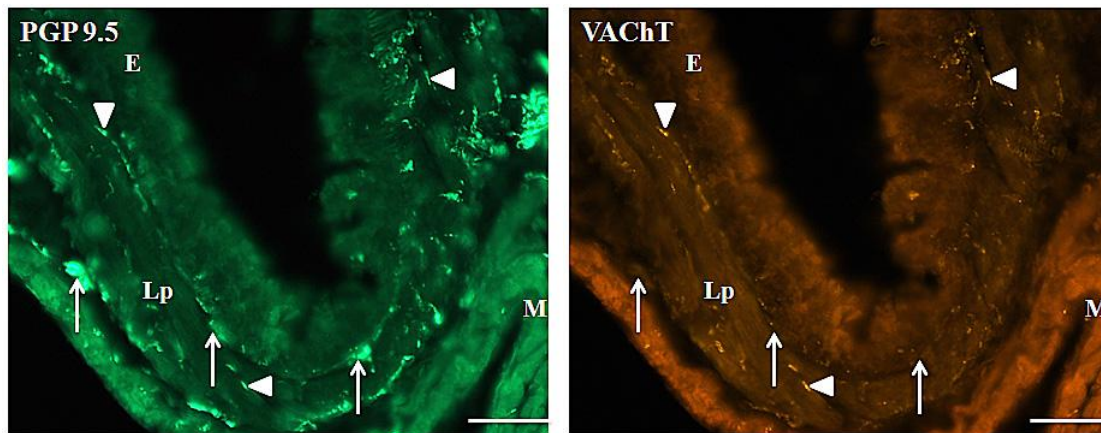


Abb. 2:

Trachea, PGP/VAcHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μ m

Δ = PGP/VAcHT $^{+/+}$, \uparrow = PGP/VAcHT $^{+/-}$, PGP/VAcHT $^{-/+}$ Fasern wurden nicht nachgewiesen.

E = Epithel, Lp = Lamina propria, M = glatte Muskulatur

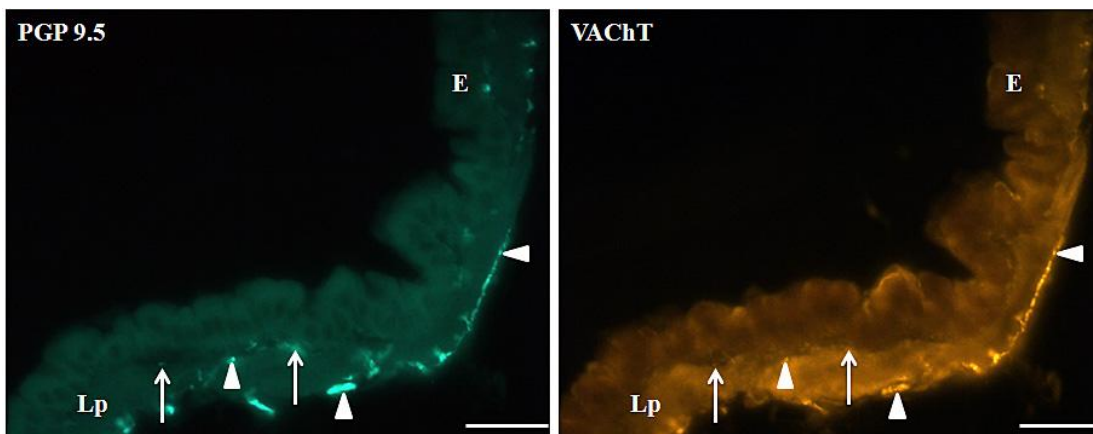


Abb. 3:

Bronchus, PGP/VAcHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μ m

Δ = PGP/VAcHT $^{+/+}$, \uparrow = PGP/VAcHT $^{+/-}$, PGP/VAcHT $^{-/+}$ Fasern wurden nicht nachgewiesen.

E = Epithel, Lp = Lamina propria

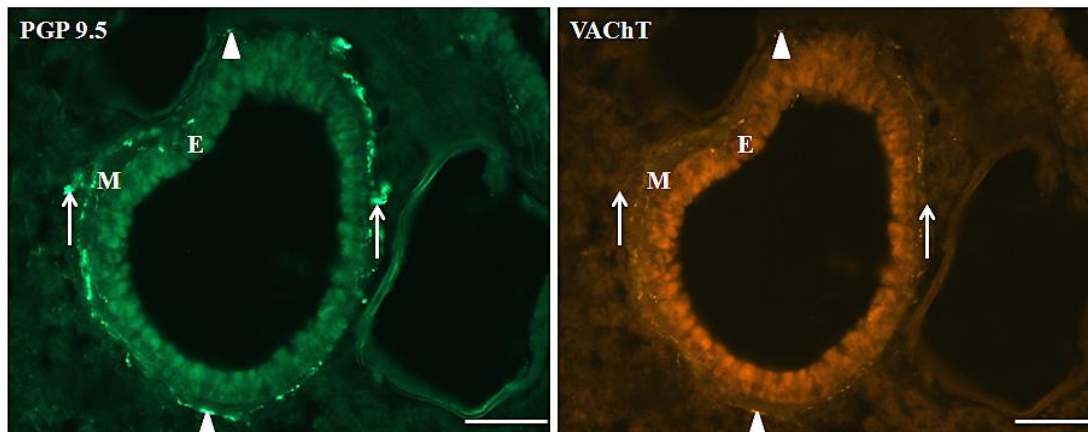


Abb. 4:

Bronchus, PGP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μ m

Δ = PGP/VACHT $^{+/+}$, \uparrow = PGP/VACHT $^{+/-}$, PGP/VACHT $^{-/-}$ Fasern wurden nicht nachgewiesen.

E = Epithel, M = glatte Muskulatur

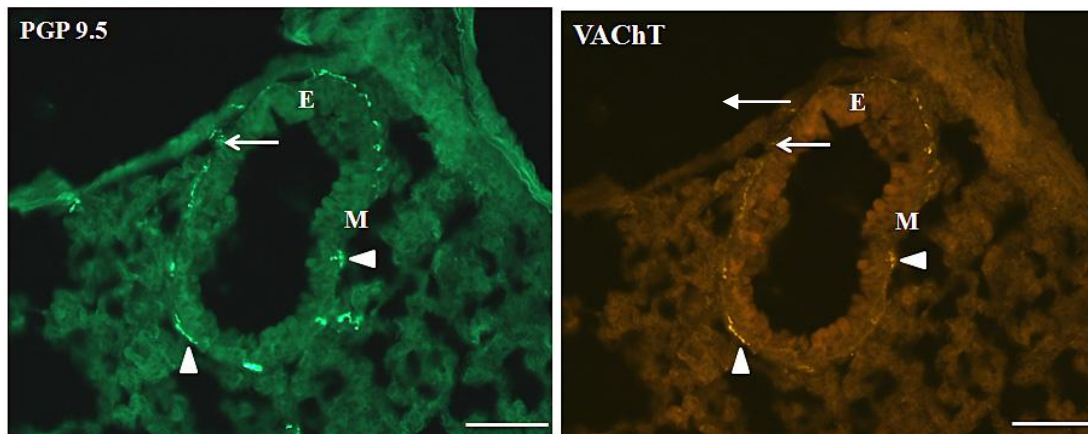


Abb. 5:

Bronchiolus, PGP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μ m

Δ = PGP/VACHT $^{+/+}$, \uparrow = PGP/VACHT $^{+/-}$, PGP/VACHT $^{-/-}$ Fasern wurden nicht nachgewiesen.

E = Epithel, M = glatte Muskulatur

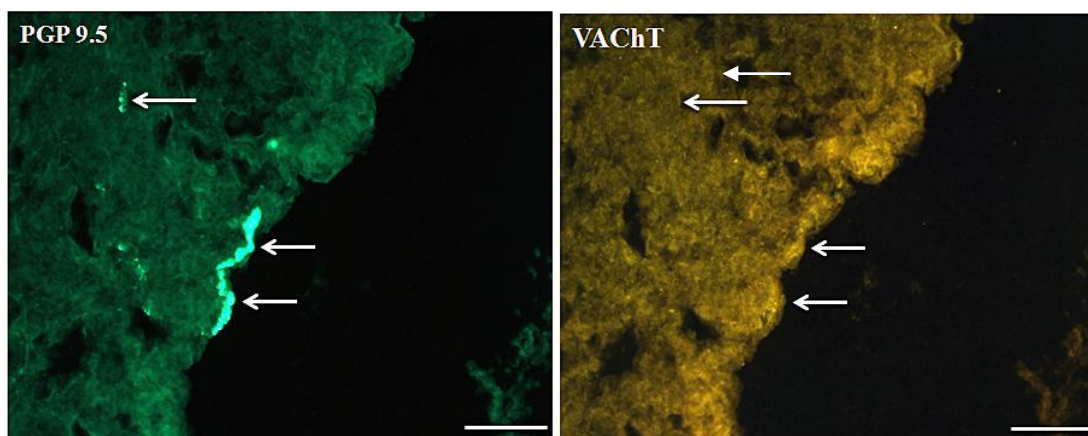


Abb. 6:

Pleura, PGP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μ m

\uparrow = PGP/VACHT $^{+/-}$, PGP/VACHT $^{-/-}$ und PGP/VACHT $^{+/+}$ Fasern wurden nicht nachgewiesen.

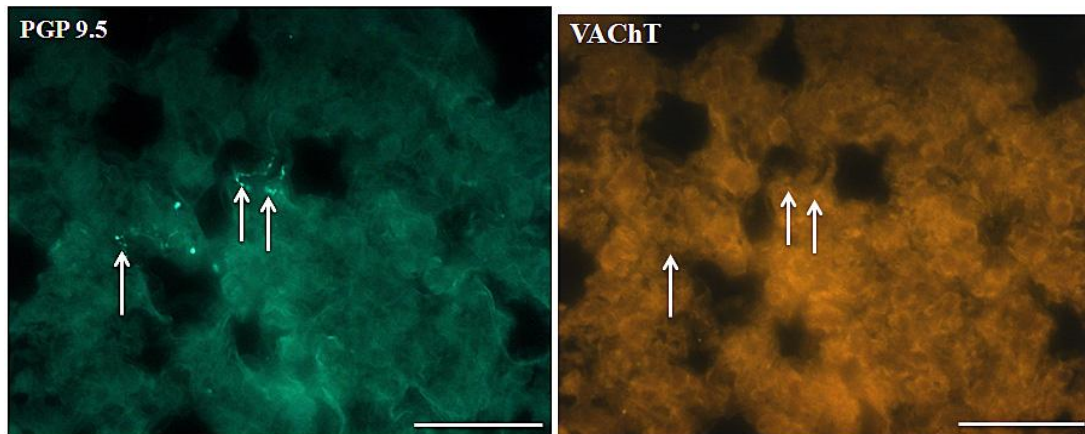


Abb. 7:

Alveolarregion, PGP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μm

↑=PGP/VACHT^{+/+}, PGP/VACHT^{-/+} und PGP/VACHT^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

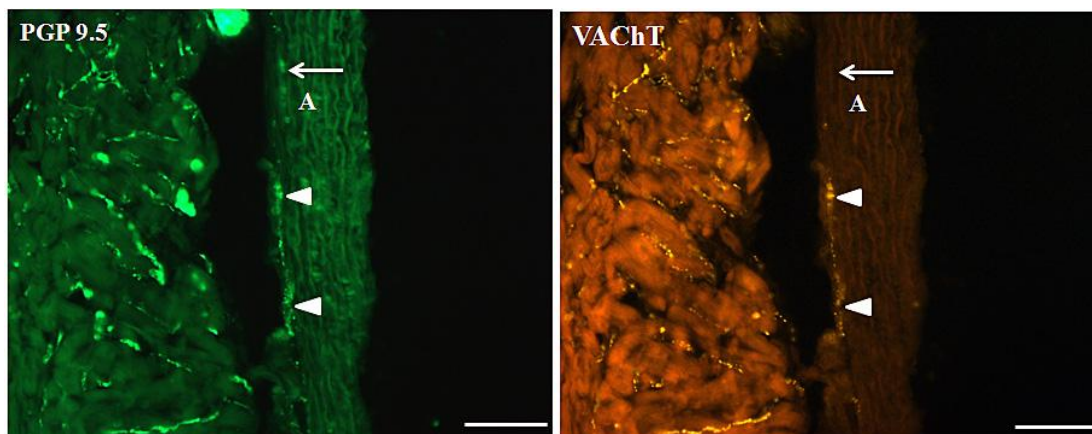


Abb. 8:

Pulmonalarterie extrapulmonal, PGP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μm

Δ = PGP/VACHT^{+/+}, ↑=PGP/VACHT^{+/+}, PGP/VACHT^{-/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

A = Arterie. In der linken Bildhälfte ist der dicht innervierte Herzvorhof zu sehen.

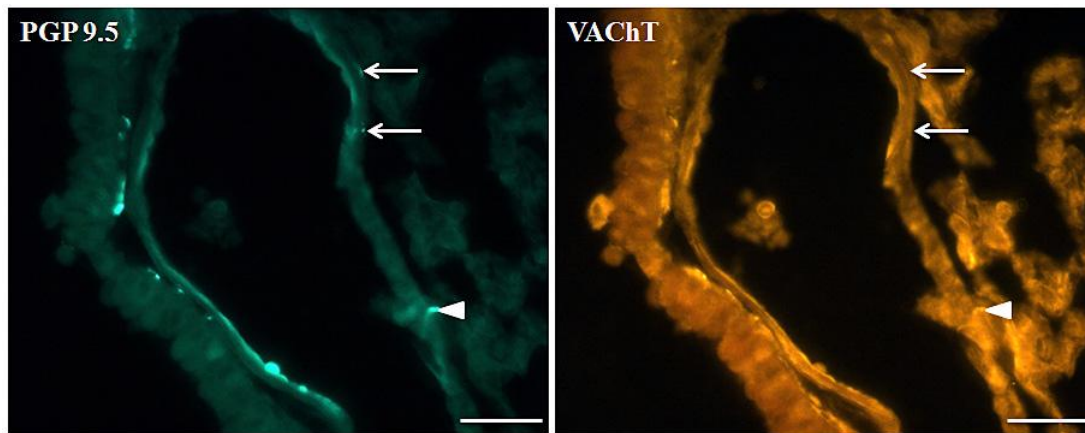


Abb. 9:
Pulmonalarterie intrapulmonal, PGP/VAcHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μ m
 Δ = PGP/VAcHT $^{+/+}$, \uparrow =PGP/VAcHT $^{+/-}$, PGP/VAcHT $^{-/+}$ Fasern wurden nicht nachgewiesen.

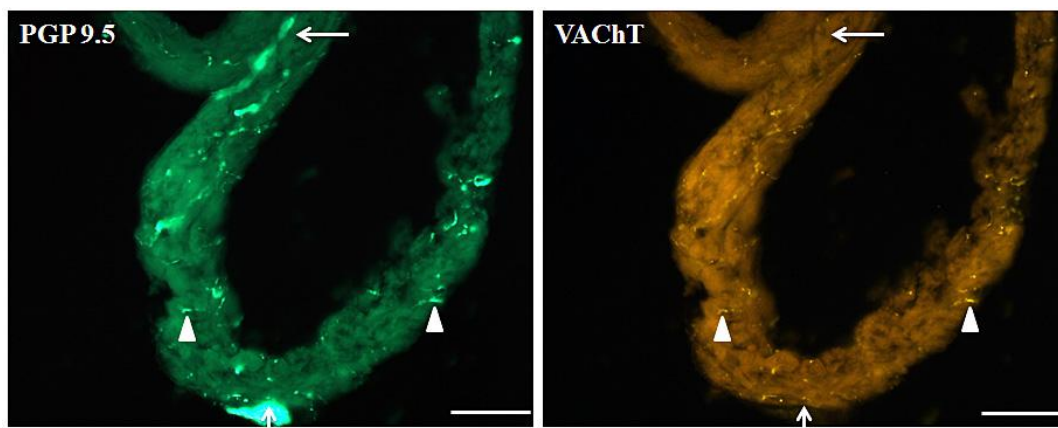


Abb. 10:
Pulmonalvene extrapulmonal, PGP/VAcHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μ m
 Δ = PGP/VAcHT $^{+/+}$, \uparrow =PGP/VAcHT $^{+/-}$, PGP/VAcHT $^{-/+}$ Fasern wurden nicht nachgewiesen.

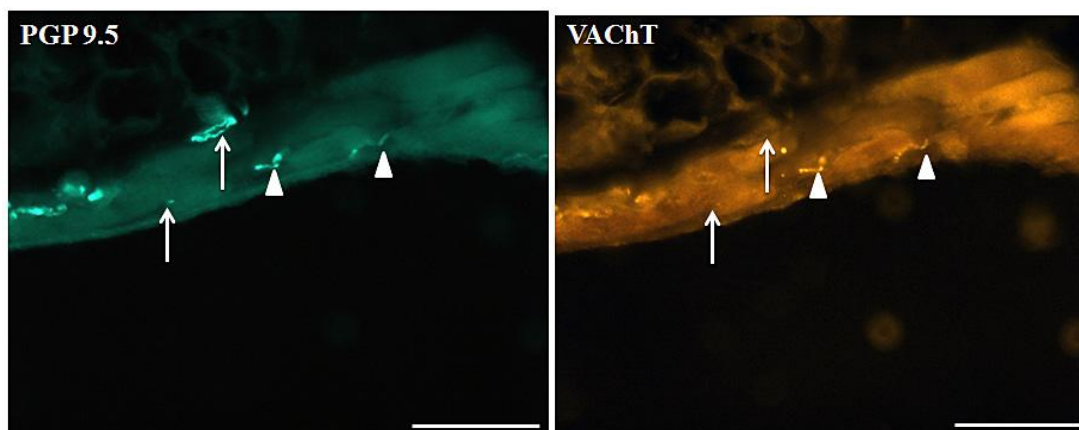


Abb. 11:
Pulmonalvene intrapulmonal, PGP/VAcHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μ m
 Δ = PGP/VAcHT $^{+/+}$, \uparrow =PGP/VAcHT $^{+/-}$, PGP/VAcHT $^{-/+}$ Fasern wurden nicht nachgewiesen.

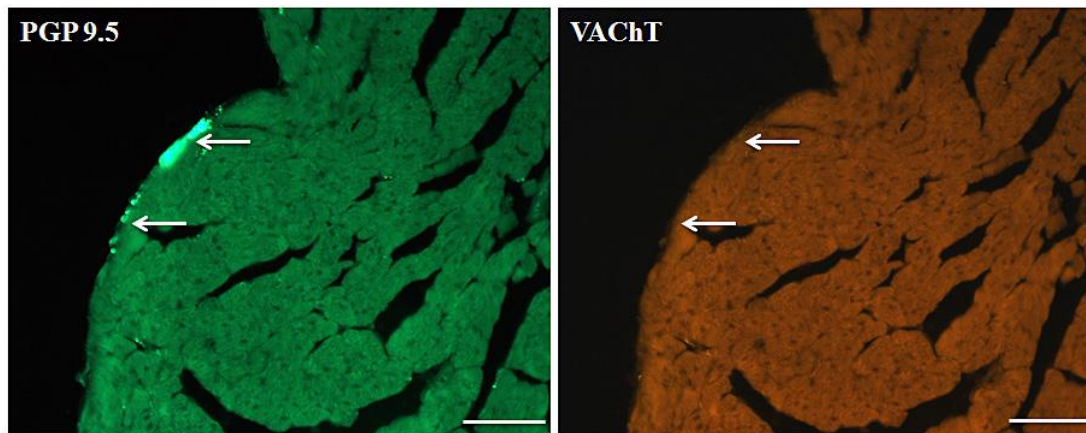


Abb. 12:

Epikard, PGP/VACht-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μ m

↑=PGP/VACht ^{+/+}, PGP/VACht ^{-/+} und PGP/VACht ^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

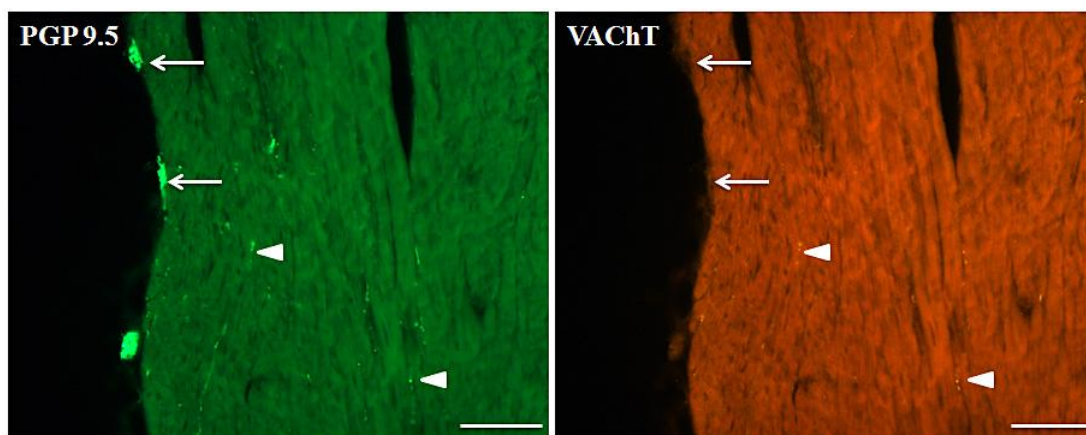


Abb. 13:

Endokard, PGP/VACht-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μ m

Δ = PGP/VACht ^{+/+}, ↑=PGP/VACht ^{+/+}, PGP/VACht ^{-/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

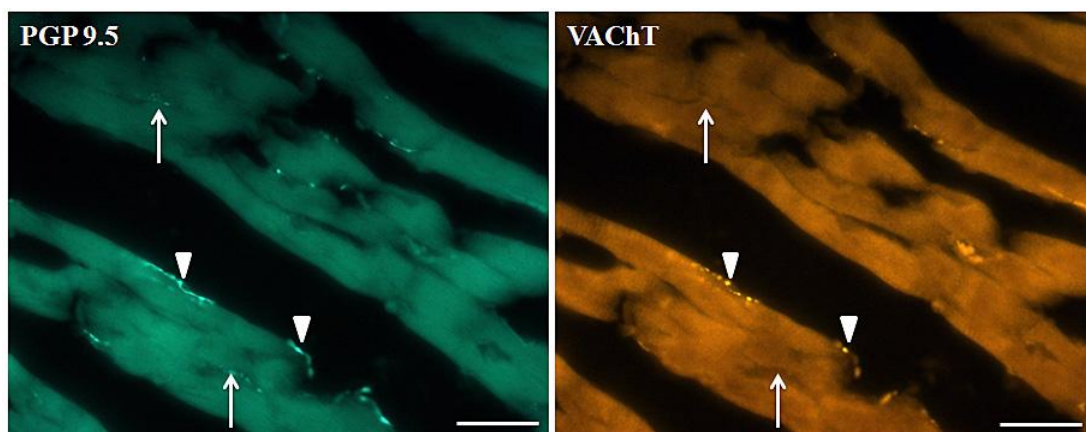


Abb. 14:

Myokard, PGP/VACht-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μ m

Δ = PGP/VACht ^{+/+}, ↑=PGP/VACht ^{+/+}, PGP/VACht ^{-/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

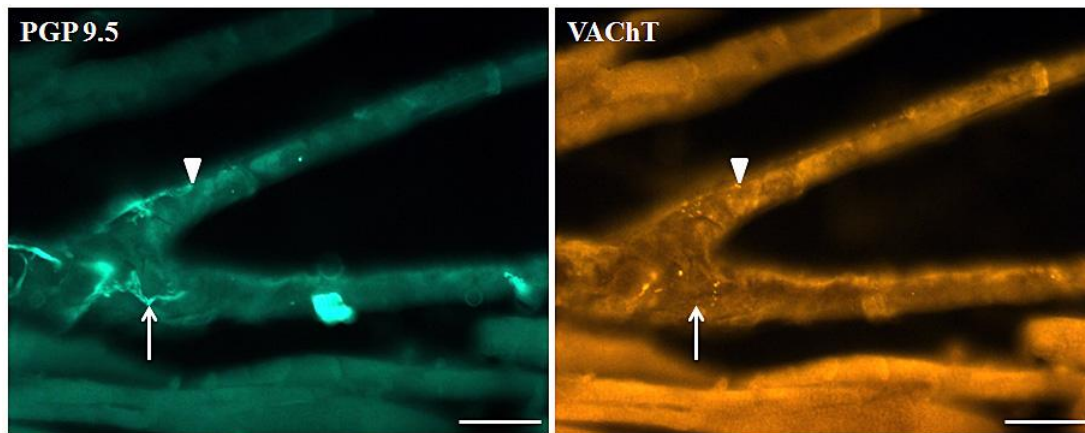


Abb. 15:
 Koronararterie, PGP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μm
 Δ = PGP/VACHT $^{+/+}$, \uparrow = PGP/VACHT $^{+/-}$, PGP/VACHT $^{-/+}$ Fasern wurden nicht nachgewiesen.

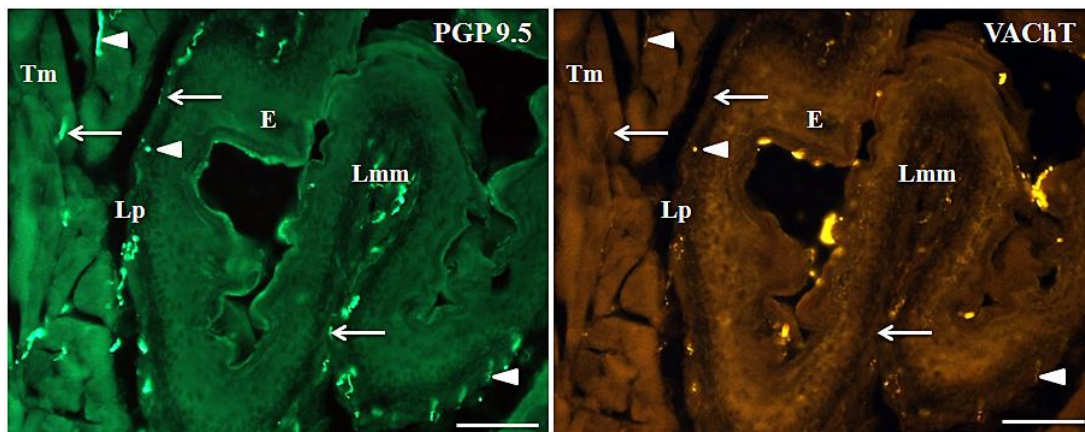


Abb. 16:
 Ösophagus, PGP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μm
 Δ = PGP/VACHT $^{+/+}$, \uparrow = PGP/VACHT $^{+/-}$, PGP/VACHT $^{-/+}$ Fasern wurden nicht nachgewiesen.
 E = Epithel, Lp = Lamina propria, Lmm = Lamina muscularis mucosae, Tm = Tunica muscularis

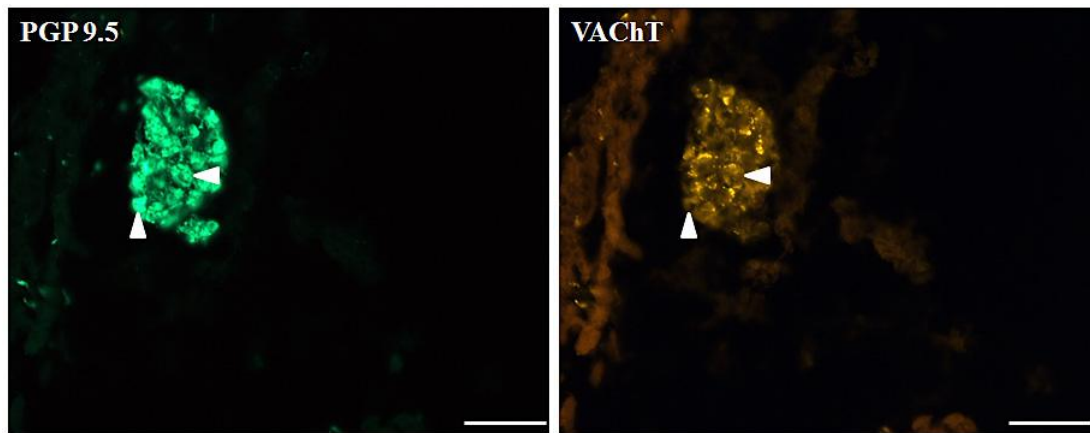


Abb. 17:

Ganglion, PGP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μm

Δ = PGP/VACHT^{+/+} Fasern und Zellkörpern in einem Ganglion, PGP/VACHT^{+/-} Fasern wurden in geringerer Zahl ebenfalls markiert, an diesem Präparat jedoch nicht separat dargestellt, PGP/VACHT^{-/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

3.3 Doppelmarkierung von VACHT und VIP

3.3.1 Trachea, Lunge und Pulmonalgefäße

VACHT/VIP^{+/+} Fasern

Eine Innervation mit diesem Fasertyp wurde in keinem der untersuchten Abschnitte nachgewiesen.

VACHT/VIP^{+/-} Fasern

Im gesamten respiratorischen Epithel sowohl der Trachea als auch der Bronchien konnte keine Innervation durch VACHT-positive Fasern nachgewiesen werden. Die Lamina propria der Trachea und der Bronchien zeigte eine spärliche Innervation, während die glatte Muskulatur dieser Abschnitte eine hohe Innervationsdichte aufwies (Abb. 18, Abb. 19). Die glatte Muskulatur der Bronchioli hingegen zeigte deutlich weniger immunreaktive Fasern (Abb. 20). Die extrapulmonalen Arterien waren im Gegensatz zu den intrapulmonalen Arterien innerviert. Die Pulmonalvenen zeigten extrapulmonal eine stärkere Innervation durch VACHT/VIP^{+/-} Fasern als intrapulmonal (Abb. 21). Die Pleura und die Alveolarregion waren nicht innerviert.

VACHT/VIP -/+ Fasern

Das respiratorische Epithel wurde durch diesen Fasertyp nicht innerviert und auch in der Lamina propria der Trachea und Bronchien konnten keine immunreaktiven Fasern nachgewiesen werden. Die glatte Muskulatur der Bronchien wurde vereinzelt an sehr wenigen Stellen innerviert, während VACHT/VIP -/+ Fasern in der glatten Muskulatur der Trachea und Bronchioli nur selten beobachtet werden konnten. Die Pleura und die Alveolarregion waren nicht innerviert, ebenso enthielten die Pulmonalarterien keine immunreaktiven Fasern. Die Pulmonalvenen zeigten intra- und extrapulmonal eine geringe Innervationsdichte (Abb. 21).

3.3.2 Herz, Koronararterien und Ösophagus

VACHT/VIP +/- Fasern

In den untersuchten Abschnitten konnte dieser Fasertyp nicht nachgewiesen werden.

VACHT/VIP +/- Fasern

In den koronaren Muskelschichten zeigten sowohl das Myokard als auch das Epi- und vereinzelt das Endokard immunreaktive Fasern, und auch die Koronararterien wurden spärlich durch cholinerge Fasern innerviert. Im Ösophagus konnte in allen Schichten eine äquivalente Verteilung VACHT-positiver Fasern nachgewiesen werden (Abb. 22, Abb. 23).

VACHT/VIP -/+ Fasern

Das Epi- und Endokard waren nicht innerviert, hingegen konnten im Myokard VIP-positive Fasern nachgewiesen werden. Die Koronararterien waren wenig innerviert. Im Ösophagus konnte eine Innervation aller drei Schichten beobachtet werden, wobei die Tunica muscularis mucosae eine stärkere Innervationsdichte gegenüber der Lamina propria und der Tunica muscularis aufwies (Abb. 22, Abb. 23).

3.3.3 Parasympathische Ganglien

In den parasympathischen Ganglien konnte keine Immunreaktion für VIP in den Zellkörpern beobachtet werden, auch wurden keine immunreaktiven Fasern für VIP nachgewiesen. Es war eine ausgeprägte rein cholinerge Innervation der Zellkörper nachweisbar, ebenfalls zeigten sich reichlich cholinerge Nervenfasern (Abb. 24). Das Markierungsmuster VAcHT/VIP +/+ wurde weder an Zellkörpern noch an Nervenfasern der parasympathischen Ganglien beobachtet.

	VACHT/VIP +/+	VACHT/ VIP +/-	VACHT /VIP -/+
Trachea			
- Epithel	-	-	-
- Lamina propria	-	+	-
- Glatter Muskel	-	+++	(+)
Lunge			
<u>Bronchi</u>			
- Epithel	-	-	-
- Lamina propria	-	+	-
- Glatter Muskel	-	+++	(+)
<u>Bronchioli</u>			
- Epithel	-	-	-
- Glatter Muskel	-	++	-
Alveolarregion	-	-	-
Pleura	-	-	-
<u>Pulmonalarterien</u>			
- Extrapulmonal	-	+	-
- Intrapulmonal	-	-	-
- Intraazinär	-	-	-
<u>Pulmonalvenen</u>			
- Extrapulmonal	-	+++	+
- Intrapulmonal	-	++	+
Herz			
- Epikard	-	+	-
- Myokard	-	++	++
- Endokard	-	(+)	-
- Koronararterien	-	+	+
Ösophagus			
- Lamina propria	-	+	+
- Lamina muscularis mucosae	-	+	++
- Tunica muscularis	-	++	+
Ganglien			
- Zellkörper	-	++	-
- Nervenfasern	-	+	-

Tab. 7 Innervationsdichte von VACHT und VIP

+++ dichte Innervation; ++ weniger dichte Innervation; + geringe Innervation; (+) vereinzelte Innervation;
- keine Innervation

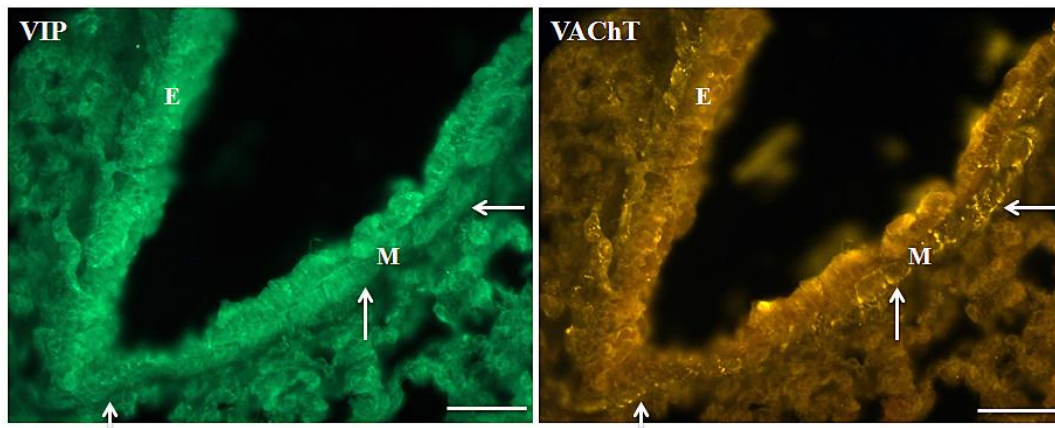


Abb. 18:

Bronchus, VIP/VACht-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μ m

↑=VIP/VACht^{-/-}, VIP/VACht^{+/-} Fasern wurden vereinzelt in der Muskulatur nachgewiesen, in diesem Präparat jedoch nicht dargestellt, VIP/VACht^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

E = Epithel, M= glatte Muskulatur

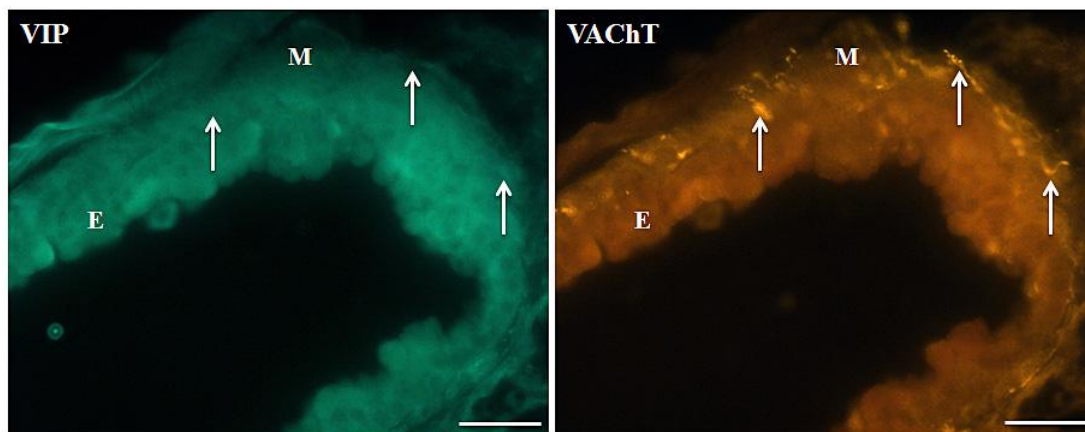


Abb. 19:

Bronchus, VIP/VACht-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μ m

↑=VIP/VACht^{-/-}, VIP/VACht^{+/-} Fasern wurden vereinzelt in der Muskulatur nachgewiesen, in diesem Präparat jedoch nicht dargestellt, VIP/VACht^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

E = Epithel, M= glatte Muskulatur

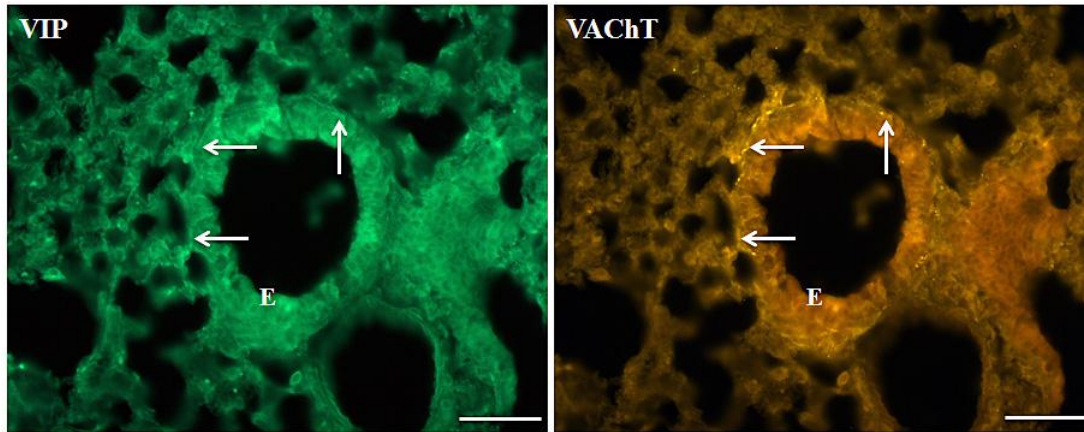


Abb. 20:
Bronchiolus, VIP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 µm
↑=VIP/VACHT^{-/+}, VIP/VACHT^{+/-} Fasern und VIP/VACHT^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.
E = Epithel

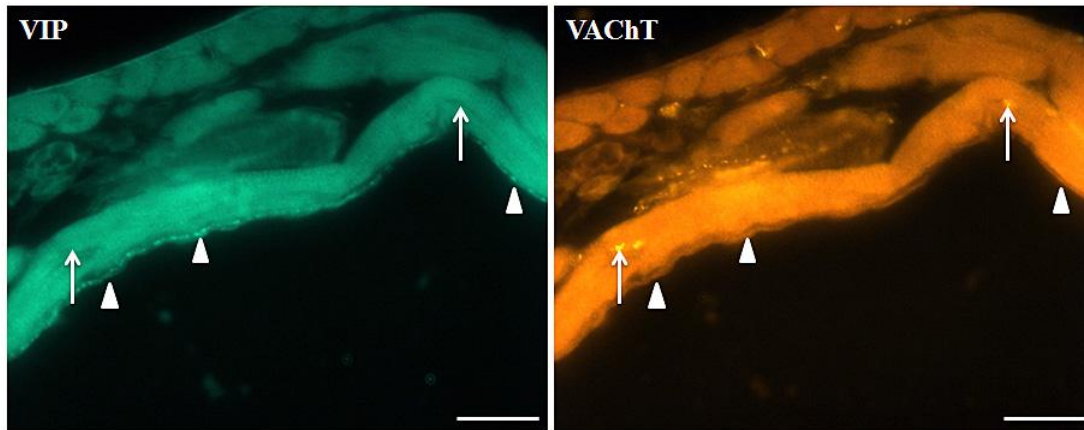


Abb. 21:
Pulmonalvene, VIP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 µm
↑=VIP/VACHT^{-/+}, △=VIP/VACHT^{+/-}, VIP/VACHT^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

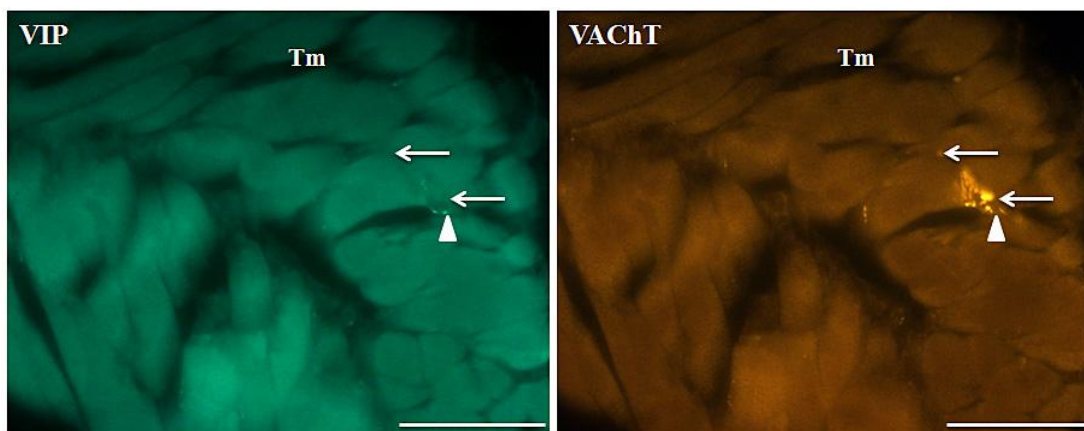


Abb. 22:
Ösophagus, VIP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 µm
↑=VIP/VACHT^{-/+}, △=VIP/VACHT^{+/-}, VIP/VACHT^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.
Tm= Tunica muscularis

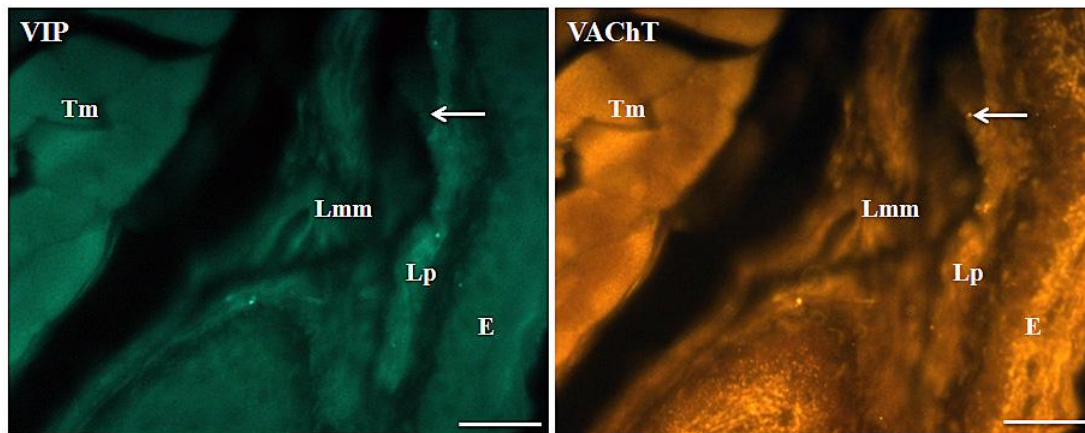


Abb. 23:

Ösophagus, VIP/VAcHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μ m

↑=VIP/VAcHT^{-/+}, VIP/VAcHT^{+/-} Fasern wurden in geringer Dichte in allen drei Schichten nachgewiesen, an diesem Präparat jedoch nicht dargestellt, VIP/VAcHT^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

E = Epithel, Lp = Lamina propria, Lmm = Lamina muscularis mucosae, Tm = Tunica muscularis

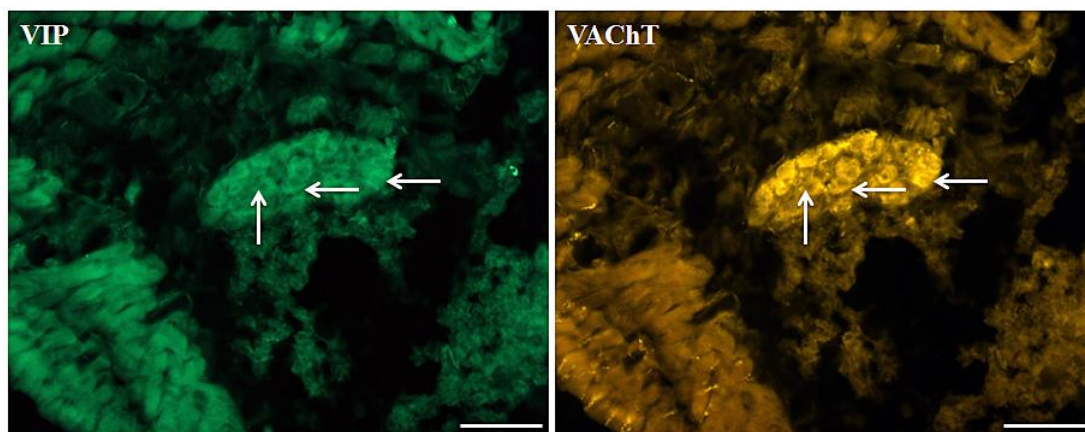


Abb. 24:

Ganglion, VIP/VAcHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μ m

↑=VIP/VAcHT^{-/+}, VIP/VAcHT^{+/-} und VIP/VAcHT^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

3.4 Doppelmarkierung von VAcHT und NPY

3.4.1 Trachea, Lunge und Pulmonalgefäße

VAcHT/NPY ^{+/+} Fasern

In den untersuchten Abschnitten wurde eine Innervation mit diesem Fasertyp nur vereinzelt in den extrapulmonalen Pulmonalvenen beobachtet. Die übrigen untersuchten Gewebe wurden nicht durch diesen Fasertyp innerviert.

VACHT/NPY +/- Fasern

Das Epithel der Trachea und Bronchien war nicht innerviert. In der Lamina propria der Trachea und Bronchien zeigten sich immunreaktive Fasern, deren Anzahl und Dichte zum glatten Muskel hin deutlich zunahm (Abb. 25, Abb. 26). Die glatte Muskulatur der Trachea und Bronchien war reichlich innerviert, die Innervation der glatten Muskulatur der Bronchioli fiel etwas spärlicher aus (Abb. 27). Die Pleura und die Alveolarregion waren nicht innerviert. Die Pulmonalarterien zeigten intra- und extrapulmonal eine spärliche Innervation durch VACHT/NPY +/- Fasern, die Pulmonalvenen waren hingegen sowohl intra- als auch extrapulmonal deutlich intensiver innerviert (Abb. 28).

VACHT/NPY -/+ Fasern

Eine Innervation des Epithels war nicht nachweisbar. Die Lamina propria der Trachea, nicht jedoch die der Bronchien zeigte eine geringe Innervation durch immunreaktive Fasern. Die glatte Muskulatur von Trachea und Bronchien war in etwa gleich intensiv innerviert, in den Bronchioli ließen sich hingegen weniger immunreaktive Fasern nachweisen (Abb. 25, Abb. 26, Abb. 27). Eine Innervation der Pleura und der Alveolarregion wurde nicht beobachtet. Die Pulmonalarterien zeigten intra- und extrapulmonal vereinzelt immunreaktive Fasern, ebenso waren die Pulmonalvenen extra- und intrapulmonal wenig innerviert (Abb. 28).

3.4.2. Herz, Koronararterien und Ösophagus

VACHT/NPY +/+ Fasern

Lediglich im Epikard und um Koronararterien konnten vereinzelt VACHT/NPY +/+ Fasern beobachtet werden, in allen übrigen Abschnitten wurde keine Kolo-kalisation von VACHT und NPY nachgewiesen (Abb. 29, Abb. 30, Abb. 31) .

VACHT/NPY +/- Fasern

Sowohl Myokard als auch im Endo- und Epikard konnten immunreaktive Fasern nachgewiesen werden (Abb. 31, Abb. 32). Die Koronararterien wurden ebenfalls cholinerg innerviert, jedoch deutlich geringer als das Myokard (Abb. 29, Abb. 30). Im Ösophagus zeigten sich immunreaktive Fasern in der Lamina propria, Tunica muscularis mucosae und Tunica muscularis (Abb. 33). In allen drei Schichten zeigte sich eine vergleichbare Innervationsdichte.

VACHT/NPY -/+ Fasern

Es konnte eine Innervation des Epi- und Myokards beobachtet werden (Abb. 31, Abb. 32), wobei das Myokard eine größere Innervationsdichte aufwies (Abb. 32). Im Endokard wurden keine immunreaktiven Fasern nachgewiesen. Die Koronararterien waren innerviert (Abb. 29, Abb. 30). Im Ösophagus zeigte sich eine schwache Innervation aller drei Schichten (Abb. 33).

3.4.3 Parasympathische Ganglien

Die Zellkörper waren für VACHT/NPY ++ und für VACHT/NPY +/- immunreaktiv. Rein NPY-positive Zellkörper wurden nicht nachgewiesen, jedoch konnten vereinzelt NPY-positive Nervenfasern beobachtet werden. Nervenfasern, die sowohl für VACHT als auch für NPY immunreaktiv waren, wurden nicht dargestellt, rein cholinerge Nervenfasern waren hingegen reichlich vorhanden (Abb. 35)

	VACHT/NPY +/+	VACHT/ NPY +/-	VACHT /NPY -/+
Trachea			
- Epithel	-	-	-
- Lamina propria	-	+	+
- Glatter Muskel	-	+++	+
Lunge			
<u>Bronchi</u>			
- Epithel	-	-	-
- Lamina propria	-	+	-
- Glatter Muskel	-	+++	+
<u>Bronchioli</u>			
- Epithel	-	-	-
- Glatter Muskel	-	++	+
Alveolarregion	-	-	-
Pleura	-	-	-
<u>Pulmonalarterien</u>			
- Extrapulmonal	-	+	+
- Intrapulmonal	-	-	+
- Intraazinär	-	-	-
<u>Pulmonalvenen</u>			
- Extrapulmonal	(+)	+++	+
- Intrapulmonal	-	++	+
Herz			
- Epikard	(+)	+	+
- Myokard	-	++	++
- Endokard	-	(+)	-
- Koronararterien	+	+	+
Ösophagus			
- Lamina propria	-	+	+
- Lamina muscularis mucosae	-	+	+
- Tunica muscularis	-	++	+
Ganglien			
- Zellkörper	++	++	-
- Nervenfasern	-	+	+

Tab. 8 Innervationsdichte von VACHT und NPY

+++ dichte Innervation; ++ weniger dichte Innervation; + geringe Innervation; (+) vereinzelte Innervation;
- keine Innervation

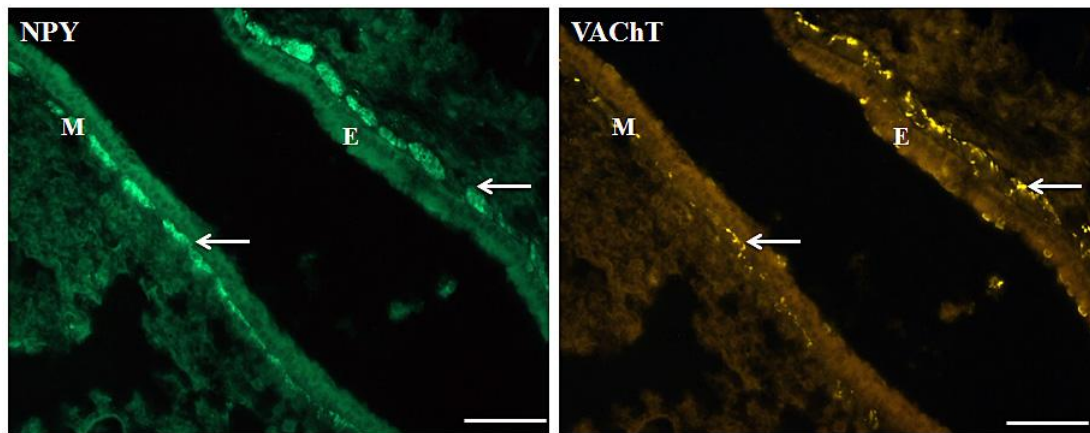


Abb. 25:

Trachea, NPY/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μ m

↑ = NPY/VACHT^{-/+}, NPY/VACHT^{+/-} Fasern wurden in der Lamina propria und der Muskulatur nachgewiesen, an diesem Präparat jedoch nicht dargestellt, NPY/VACHT^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

E = Epithel, M = glatte Muskulatur, im linken Bild unspezifische Markierung durch den Antikörper

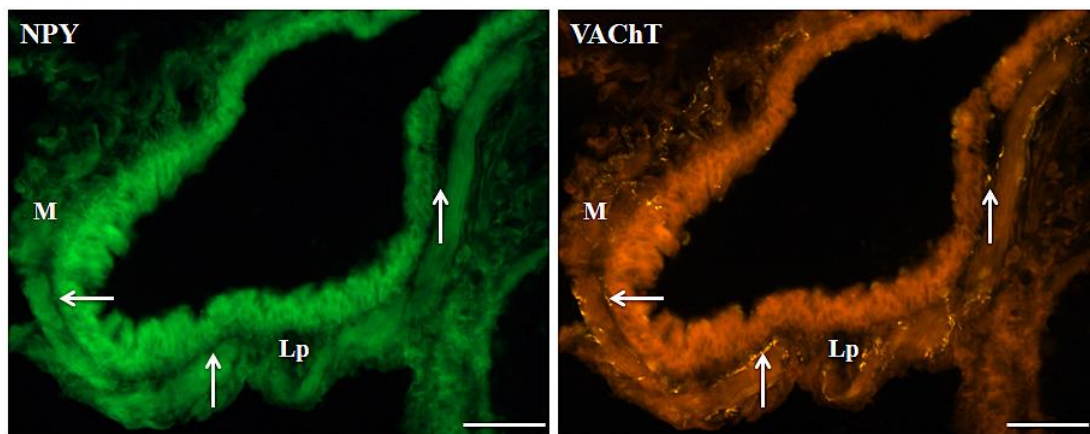


Abb. 26:

Bronchus, NPY/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μ m

↑ = NPY/VACHT^{-/+}, NPY/VACHT^{+/-} Fasern wurden in der Lamina propria und der Muskulatur nachgewiesen, an diesem Präparat jedoch nicht dargestellt, NPY/VACHT^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

M = glatte Muskulatur, Lp = Lamina propria

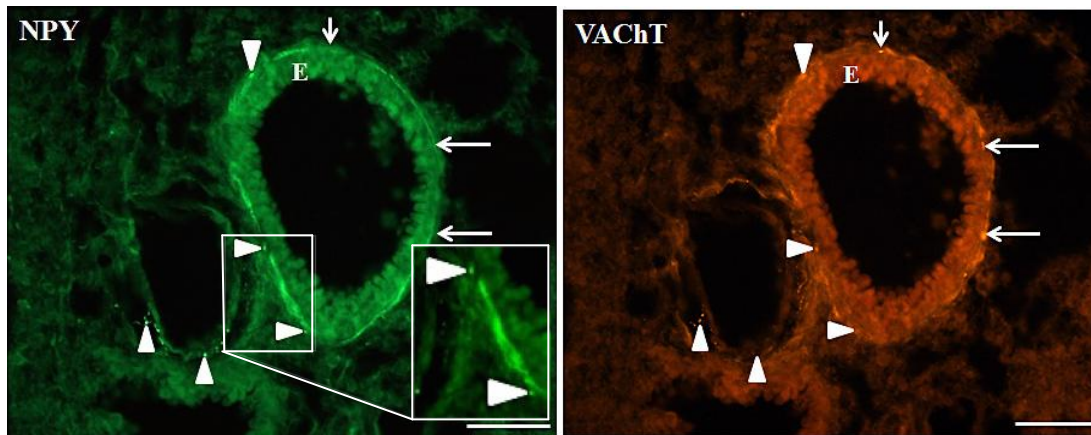


Abb. 27:
Bronchiolus und Pulmonalvene, NPY/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μm
 \uparrow =NPY/VACHT $^{-/+}$, Δ =NPY/VACHT $^{+/-}$, NPY/VACHT $^{+/+}$ Fasern wurden nicht nachgewiesen.
 E = Epithel. Zur besseren Darstellung sind immunreaktive Fasern im Bildausschnitt links vergrößert dargestellt.

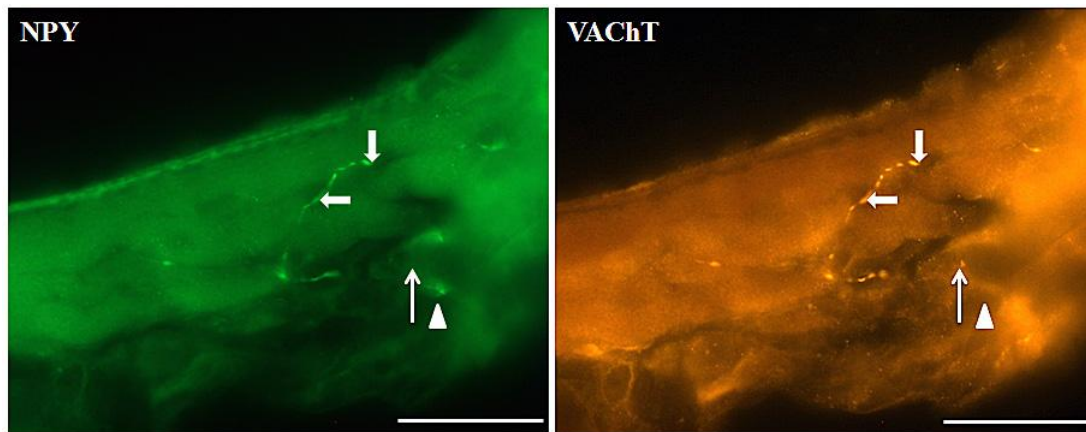


Abb. 28:
Pulmonalvene extrapulmonal, NPY/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μm
 \uparrow =NPY/VACHT $^{-/+}$, Δ =NPY/VACHT $^{+/-}$, $\uparrow\uparrow$ =NPY/VACHT $^{+/+}$

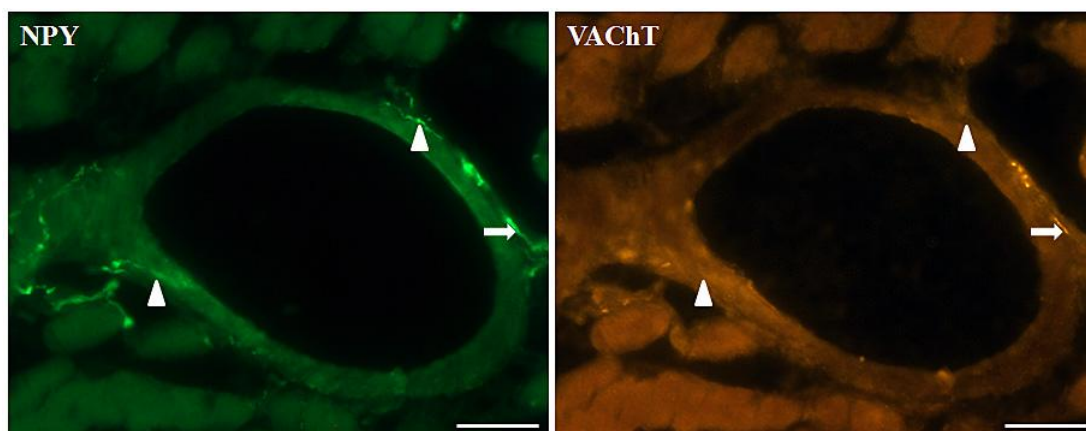


Abb. 29:
Koronararterie, NPY/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μm
 \uparrow =NPY/VACHT $^{-/+}$, Δ =NPY/VACHT $^{+/-}$, $\uparrow\uparrow$ =NPY/VACHT $^{+/+}$

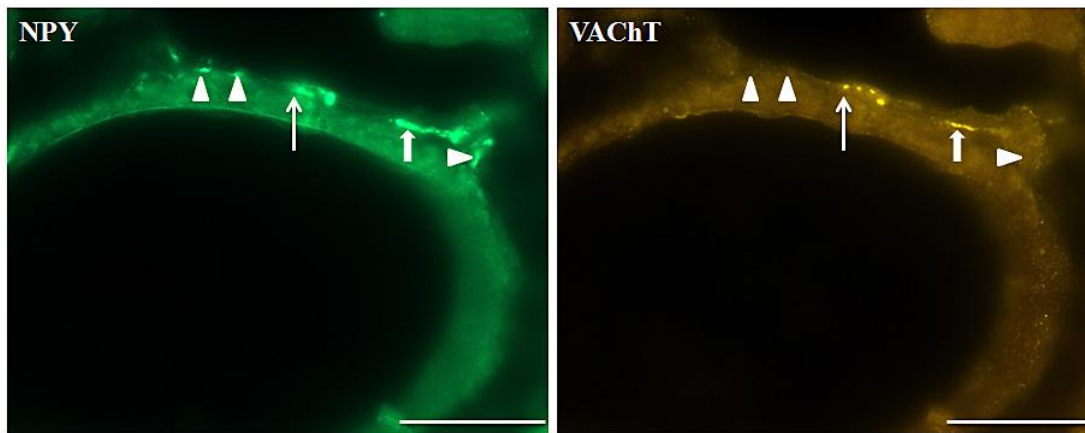


Abb. 30:
Koronararterie, NPY/VChT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 µm
↑=NPY/VChT^{-/+}, Δ=NPY/VChT^{+/-}, ↑↑=NPY/VChT^{+/+}

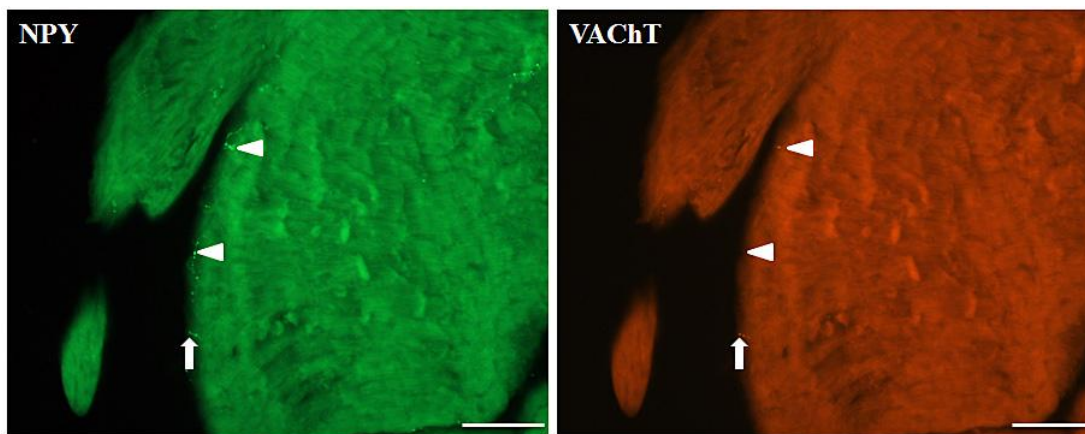


Abb. 31:
Epikard, NPY/VChT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 µm
↑=NPY/VChT^{-/+}, Δ=NPY/VChT^{+/-}, ↑↑=NPY/VChT^{+/+}

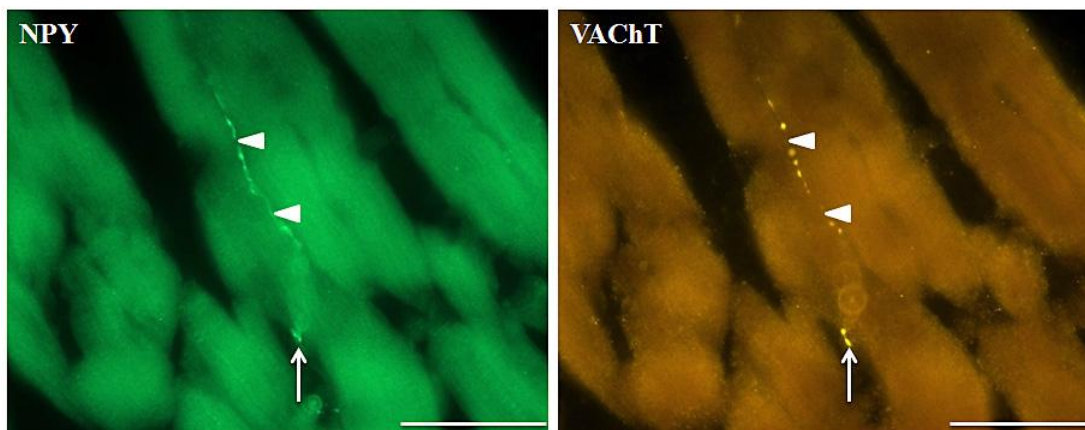


Abb. 32:
Myokard, NPY/VChT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 µm
↑=NPY/VChT^{-/+}, Δ=NPY/VChT^{+/-}, NPY/VChT^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

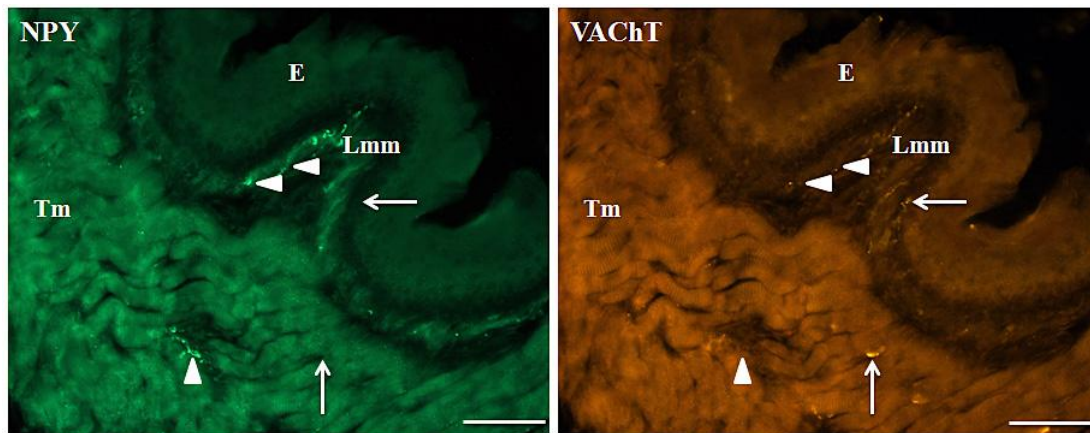


Abb. 33:

Ösophagus, NPY/VChT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μm

↑=NPY/VChT $^{-/+}$, Δ=NPY/VChT $^{+/-}$, NPY/VChT $^{+/+}$ Fasern wurden nicht nachgewiesen.

Tm = Tunica muscularis, Lmm = Lamina muscularis mucosae, E = Epithel

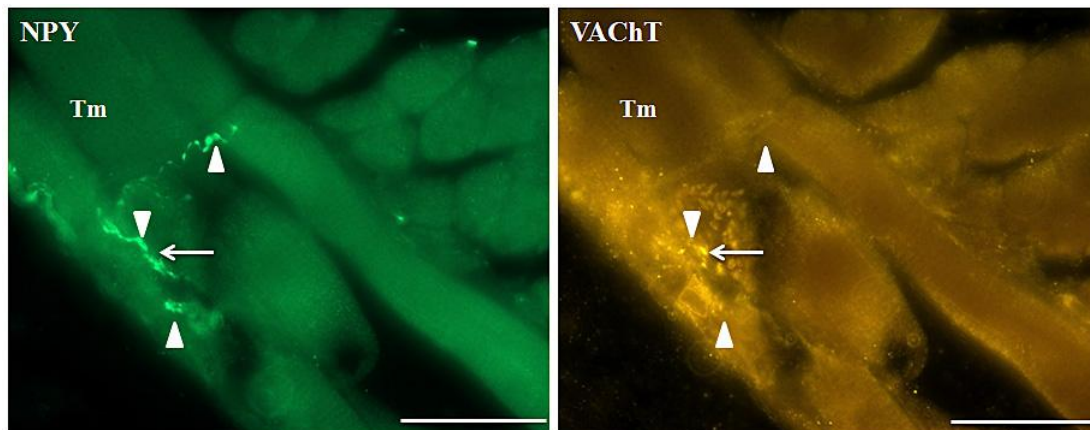


Abb. 34:

Ösophagus, NPY/VChT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μm

↑=NPY/VChT $^{-/+}$, Δ=NPY/VChT $^{+/-}$, NPY/VChT $^{+/+}$ Fasern wurden nicht nachgewiesen.

Tm = Tunica muscularis

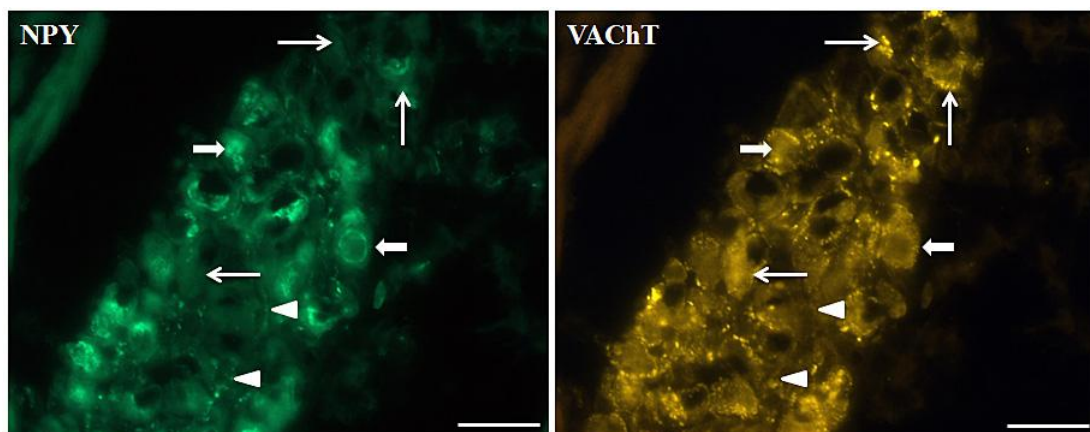


Abb. 35:

Ganglion, NPY/VChT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μm

↑=NPY/VChT $^{-/+}$, Δ=NPY/VChT $^{+/-}$, ⌈=NPY/VChT $^{+/+}$

3.5 Doppelmarkierung von VAcHT und TH

3.5.1 Trachea, Lunge und Pulmonalgefäße

VAcHT/TH +/+ Fasern

Dieser Fasertyp konnte in den untersuchten Gewebeschichten nicht dargestellt werden.

VAcHT/TH +/- Fasern

Dieser Fasertyp verhält sich wie bereits unter VAcHT/VIP +/- (Kapitel 3.3.1) und VAcHT/NPY +/- (Kapitel 3.4.1) beschrieben.

VAcHT/TH -/+ Fasern

Im respiratorischen Epithel von Trachea und Bronchien wurden keine immunreaktiven Fasern nachgewiesen, es zeigte sich jedoch eine Innervation der glatten Muskulatur der Trachea, der Bronchi und Bronchioli, wobei die Muskulatur der Trachea am kräftigsten innerviert war (Abb. 30, Abb. 31). In der Pleura und der Alveolarregion wurden keine VAcHT/TH -/+ Fasern nachgewiesen. Die Pulmonalarterien waren extrapulmonal (Abb. 32), nicht jedoch intrapulmonal oder intraazinär innerviert, während die Pulmonalvenen sowohl intra- als auch extrapulmonal immunreaktive Fasern aufwiesen (Abb. 33).

3.5.2 Herz, Koronargefäße und Ösophagus

VAcHT/ TH +/+ Fasern

Es wurden in den untersuchten Gewebeschichten keine VAcHT/TH +/+ Fasern nachgewiesen.

VACHT/TH +/- Fasern

Dies wurde in den vorangehenden Abschnitten bereits beschrieben (siehe Kapitel 3.3.2 und Kapitel 3.4.2)

VACHT/TH -/+ Fasern

In den Koronararterien, im Epikard und Myokard gelang der Nachweis immunreaktiver Fasern, wobei das Myokard etwas stärker innerviert war. Eine Innervation des Endokards wurde nicht dargestellt. Im Ösophagus waren die Lamina muscularis mucosae und die Tunica muscularis, nicht jedoch die Lamina propria innerviert (Abb. 40).

3.5.3 Parasympathische Ganglien

Die parasympathischen Ganglien zeigten vereinzelt immunreaktive Fasern für TH und reichlich VACHT-positive Fasern. Die Zellkörper waren cholinerg, nicht aber noradrenerg innerviert (Abb. 41). VACHT/TH ++ wurde weder in den Zellkörpern noch in den Nervenfasern nachgewiesen.

	VACht/TH +/+	VACht/ TH +/-	VACht /TH -/+
Trachea			
- Epithel	-	-	-
- Lamina propria	-	+	-
- Glatter Muskel	-	+++	+
Lunge			
<u>Bronchi</u>			
- Epithel	-	-	-
- Lamina propria	-	+	-
- Glatter Muskel	-	+++	+
<u>Bronchioli</u>			
- Epithel	-	-	-
- Glatter Muskel	-	++	+
Alveolarregion	-	-	-
Pleura	-	-	-
<u>Pulmonalarterien</u>			
- Extrapulmonal	-	+	+
- Intrapulmonal	-	-	-
- Intraazinär	-	-	-
<u>Pulmonalvenen</u>			
- Extrapulmonal	-	+++	+
- Intrapulmonal	-	++	+
Herz			
- Epikard	-	+	+
- Myokard	-	++	++
- Endokard	-	(+)	-
- Koronararterien	-	+	+
Ösophagus			
- Lamina propria	-	+	-
- Lamina muscularis mucosae	-	+	+
- Tunica muscularis	-	++	+
Ganglien			
- Zellkörper	-	++	-
- Nervenfasern	-	+	+

Tab. 9 Innervationsdichte von VACht und TH

+++ dichte Innervation; ++ weniger dichte Innervation; + geringe Innervation; (+) vereinzelte Innervation;
- keine Innervation

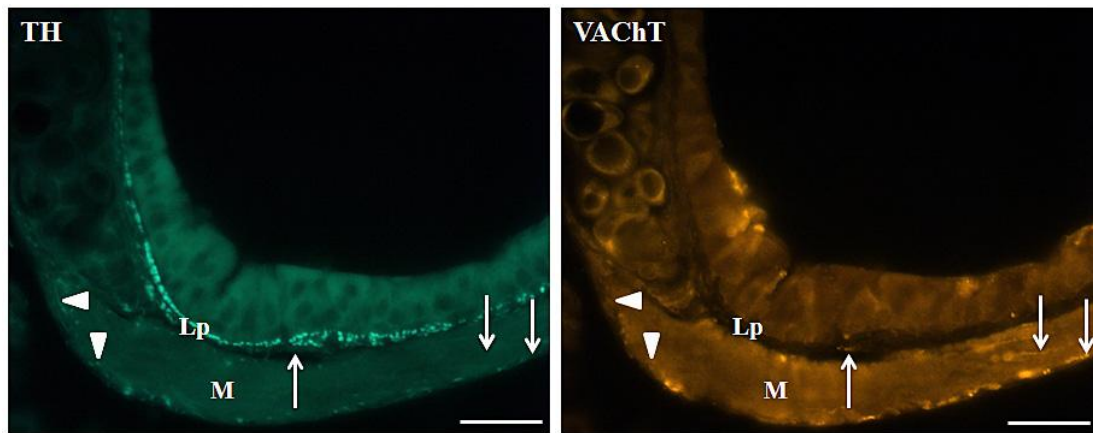


Abb. 36:

Trachea, TH/VACht-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μ m

↑=TH/VACht^{-/+}, △=TH/VACht^{+/-}, TH/VACht^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

E = Epithel, Lp = Lamina propria, M = glatte Muskulatur

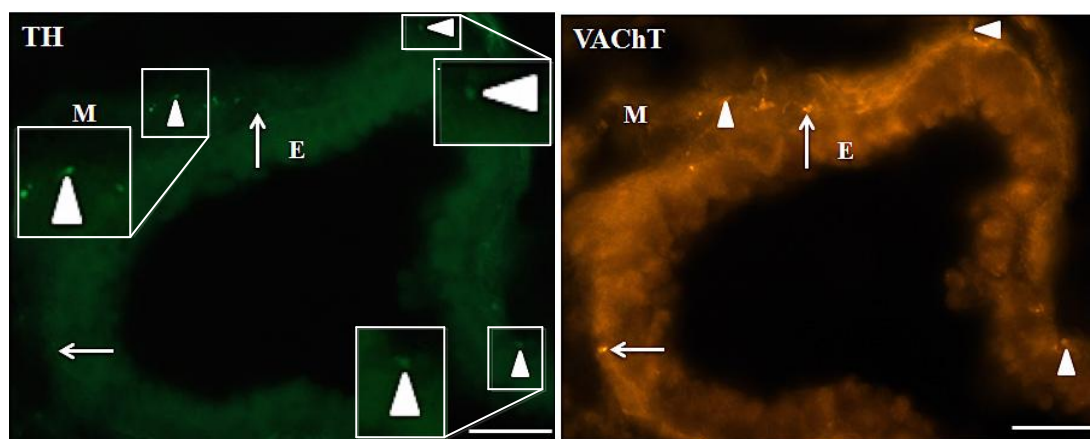


Abb. 37:

Bronchus, TH/VACht-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μ m

↑=TH/VACht^{-/+}, △=TH/VACht^{+/-}, TH/VACht^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

E = Epithel, M = glatte Muskulatur. Zur besseren Darstellung sind immunreaktive Fasern im Bildausschnitt links vergrößert dargestellt.

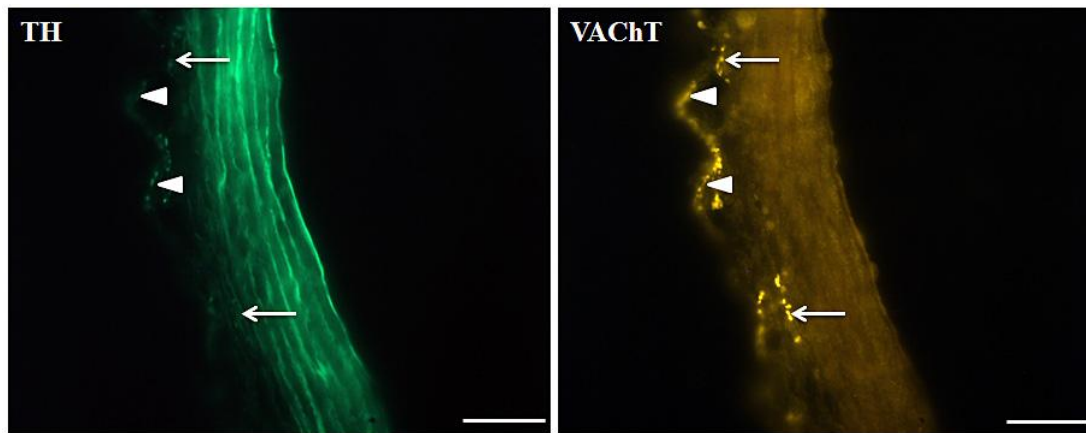


Abb. 38:

Arterie extrapulmonal, TH/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μm

\uparrow =TH/VACHT^{-/-}, Δ =TH/VACHT^{+/-}, TH/VACHT^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

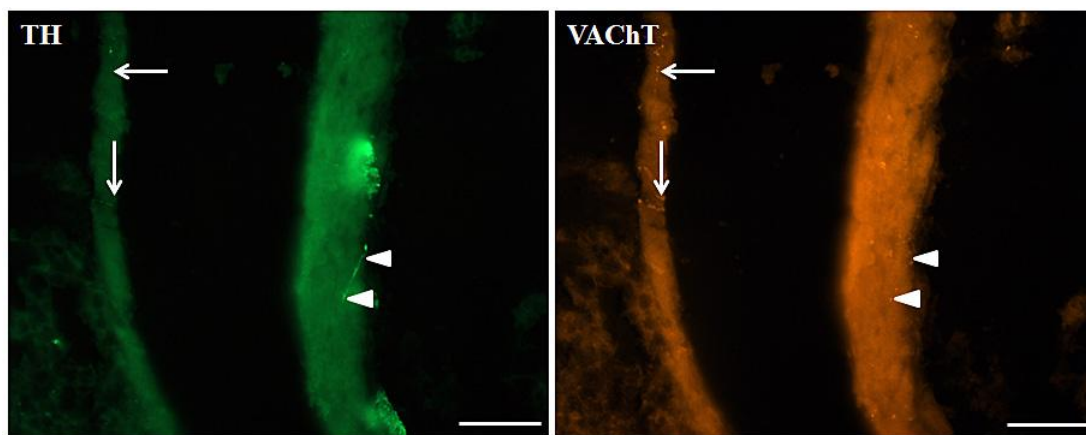


Abb. 39:

Pulmonalvene extrapulmonal, TH/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μm

\uparrow =TH/VACHT^{-/-}, Δ =TH/VACHT^{+/-}, TH/VACHT^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

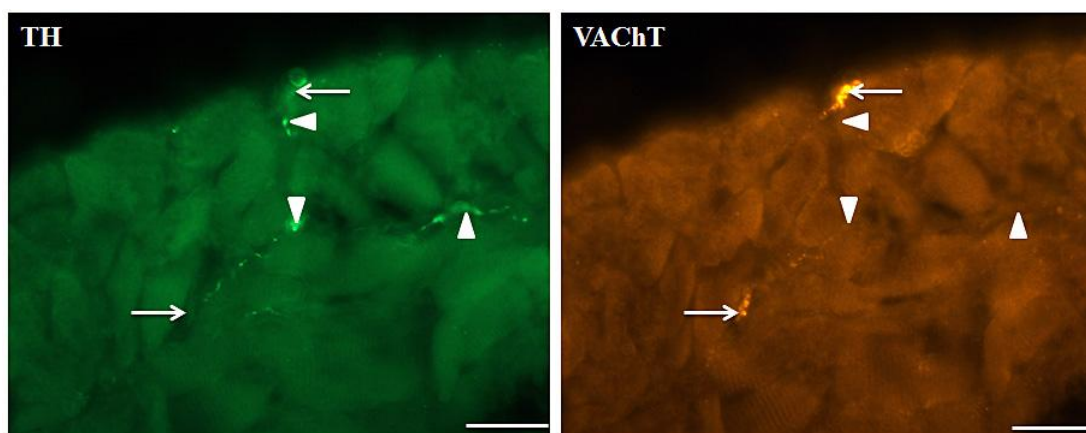


Abb. 40:

Ösophagus, Tunica muscularis, TH/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μm

\uparrow =TH/VACHT^{-/-}, Δ =TH/VACHT^{+/-}, TH/VACHT^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

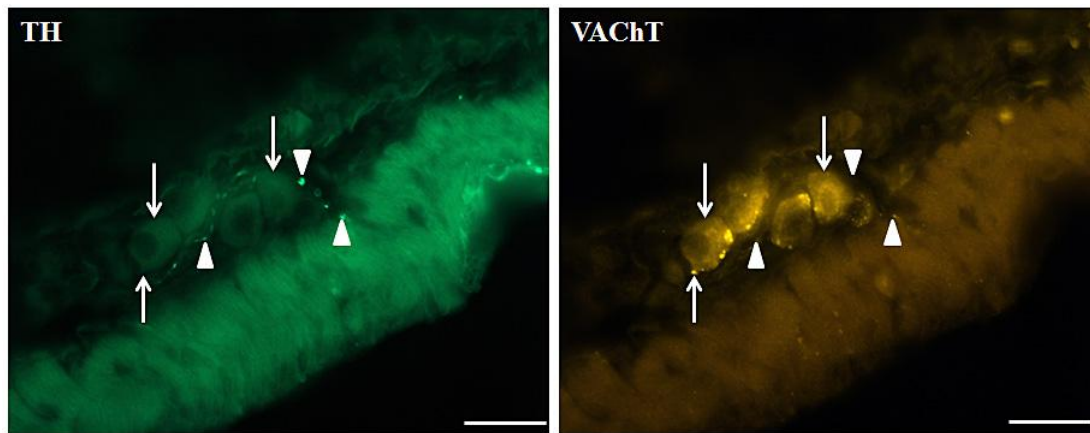


Abb. 41:

Ganglion, TH/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μm

\uparrow =TH/VACHT^{-/+}, Δ =TH/VACHT^{+/-}, TH/VACHT^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

3.6 Doppelmarkierung von VACHT und CGRP

3.6.1 Trachea, Lunge und Pulmonalgefäße

VACHT/CGRP +/+ Fasern

Dieser Fasertyp wurde in den untersuchten Gewebeschichten nicht nachgewiesen.

VACHT/CGRP +/- Fasern

Auf die Beschreibung dieses Fasertyps wurde bereits in den vorangegangenen Kapiteln eingegangen (siehe Kapitel 3.3.2 und Kapitel 3.4.1).

VACHT/CGRP -/+ Fasern

Eine Innervation des Epithels wurde nicht nachgewiesen. Die Lamina propria der Trachea, nicht jedoch die der Bronchien, wies vereinzelt immunreaktive Fasern auf, während die glatte Muskulatur sowohl der Trachea als auch der Bronchien und Bronchioli innerviert war (Abb. 42, Abb. 43, Abb. 44, Abb. 45). Die Innervation der glatten Muskulatur der Trachea und Bronchien war ähnlich stark ausgeprägt, die Muskulatur der Bronchioli wies hingegen eine geringere Innervationsdichte auf (Abb. 42, Abb. 43, Abb. 45). In der Pleura wurden keine, in der Alveolarregion hingegen

vereinzelt immunreaktive Fasern nachgewiesen (Abb. 46). Die Pulmonalarterien zeigten sowohl intra- als auch extrapulmonal eine geringe Innervation durch VACHT/CGRP +/- Fasern (Abb. 49). Auch die Pulmonalvenen waren intra- und extrapulmonal innerviert und wiesen eine ähnliche Innervationsdichte wie die Pulmonalarterien auf (Abb. 47, Abb. 48).

3.6.2 Herz, Koronararterien und Gefäße

VACHT/CGRP +/- Fasern

Dieser Fasertyp wurde in den untersuchten Abschnitten nicht nachgewiesen.

VACHT/CGRP +/- Fasern

Die Beschreibung der VACHT positiven Fasern ist bereits in den vorausgegangenen Kapiteln erfolgt (siehe Kapitel 3.3.2 und Kapitel 3.4.2).

VACHT/CGRP +/- Fasern

Im Epi-, Endo- und Myokard gelang die Darstellung weniger immunreaktiver Fasern (Abb. 51, Abb. 52, Abb. 53). Die Koronararterien wurden durch VACHT/CGRP +/- innerviert und zeigten eine ähnliche Innervationsdichte wie das Epi- und Myokard (Abb. 50). Im Ösophagus konnte in allen drei Schichten eine ähnlich ausgeprägte Verteilung immunreaktiver Fasern beobachtet werden (Abb. 54).

3.6.3 Parasympathische Ganglien

Die Zellkörper parasympathischer Ganglien waren immunreaktiv für VACHT, nicht jedoch für CGRP, während in den Nervenfasern eine jeweils separate Immunreaktion für VACHT und für CGRP beobachtet werden konnte (Abb. 55). VACHT/CGRP +/- Fasern wurden nicht markiert.

	VACHT/CGRP +/+	VACHT/ CGRP +/-	VACHT /CGRP -/+
Trachea			
- Epithel	-	-	-
- Lamina propria	-	+	+
- Glatter Muskel	-	+++	++
Lunge			
<u>Bronchi</u>			
- Epithel	-	-	-
- Lamina propria	-	+	-
- Glatter Muskel	-	+++	++
<u>Bronchioli</u>			
- Epithel	-	-	-
- Glatter Muskel	-	++	+
Alveolarregion	-	-	(+)
Pleura	-	-	-
<u>Pulmonalarterien</u>			
- Extrapulmonal	-	+	+
- Intrapulmonal	-	-	+
- Intraazinär	-	-	-
<u>Pulmonalvenen</u>			
- Extrapulmonal	-	+++	+
- Intrapulmonal	-	++	+
Herz			
- Epikard	-	+	+
- Myokard	-	++	+
- Endokard	-	(+)	+
- Koronararterien	-	+	+
Ösophagus			
- Lamina propria	-	+	++
- Lamina muscularis mucosae	-	+	++
- Tunica muscularis	-	++	++
Ganglien			
- Zellkörper	-	++	-
- Nervenfasern	-	+	++

Tab. 10 Innervationsdichte von VACHT und CGRP

+++ dichte Innervation; ++ weniger dichte Innervation; (+) geringe Innervation; (+) vereinzelte Innervation; - keine Innervation

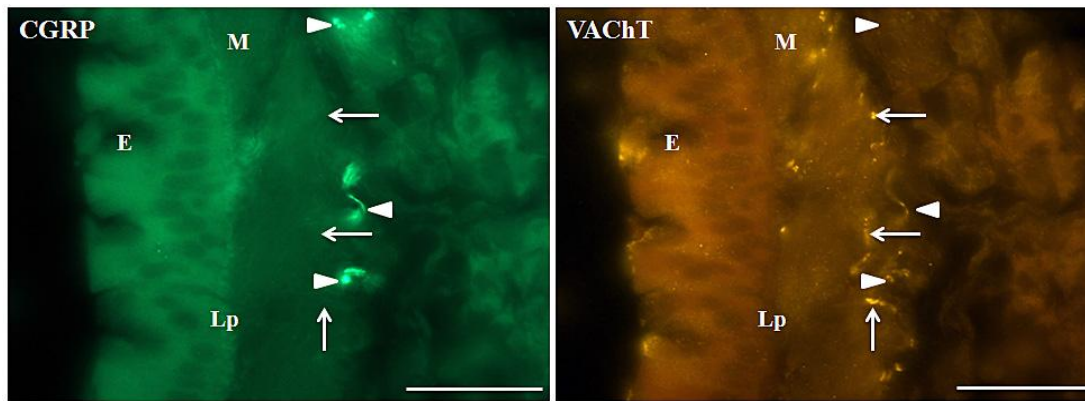


Abb. 42:

Trachea, CGRP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 µm

↑ = CGRP/VACHT^{-/-}, Δ = CGRP/VACHT^{+/-}, CGRP/VACHT^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

E = Epithel, Lp = Lamina propria, M = glatte Muskulatur

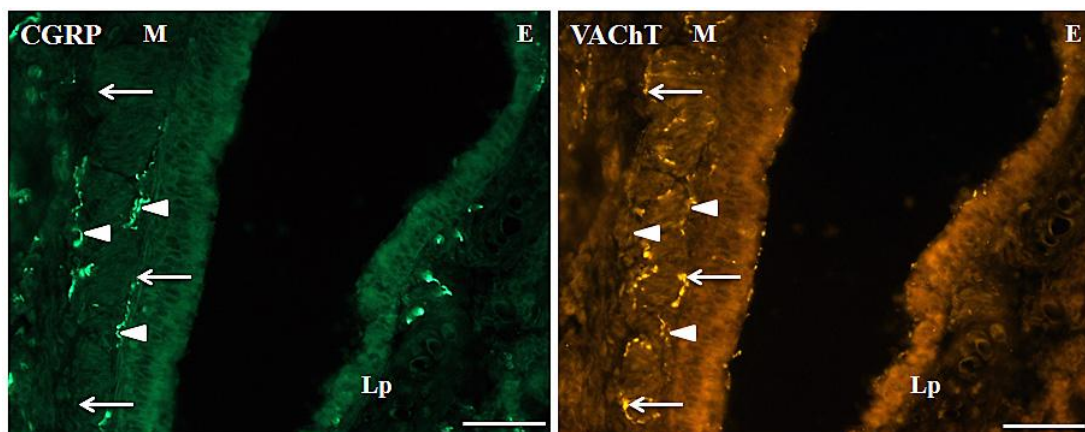


Abb. 43:

Trachea, CGRP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 µm

↑ = CGRP/VACHT^{-/-}, Δ = CGRP/VACHT^{+/-}, CGRP/VACHT^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

E = Epithel, Lp = Lamina propria, M = glatte Muskulatur

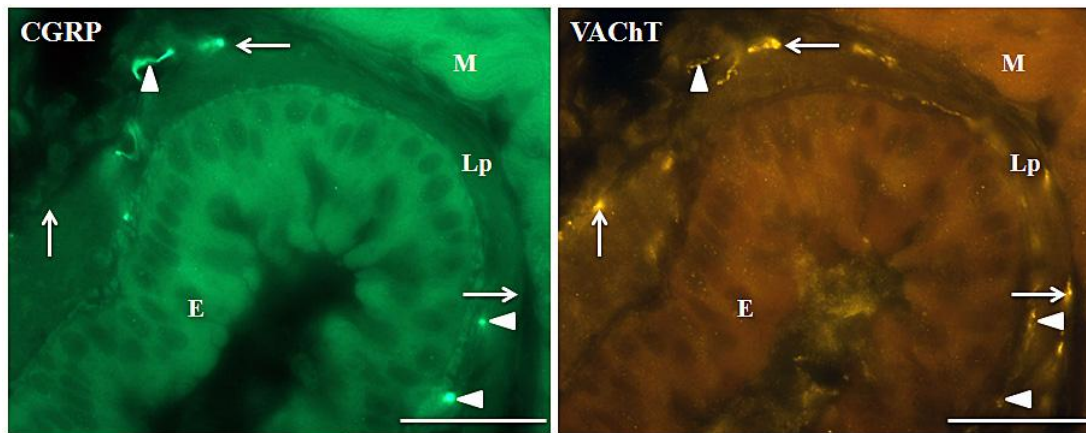


Abb. 44:

Bronchus, CGRP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 µm

↑ = CGRP/VACHT^{-/-}, Δ = CGRP/VACHT^{+/-}, CGRP/VACHT^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

E = Epithel, Lp = Lamina propria, M = glatte Muskulatur

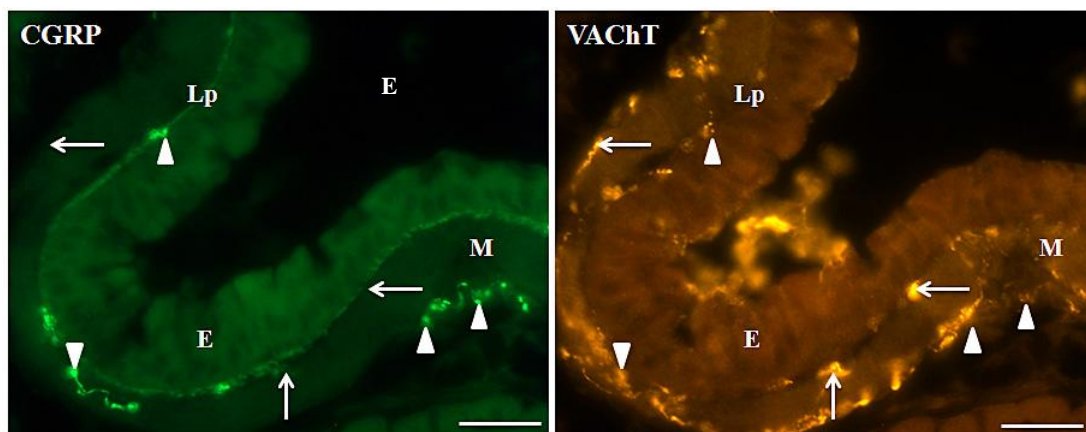


Abb. 45:

Bronchus, CGRP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 µm

↑ = CGRP/VACHT^{-/-}, Δ = CGRP/VACHT^{+/-}, CGRP/VACHT^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

E = Epithel, Lp = Lamina propria, M = glatte Muskulatur

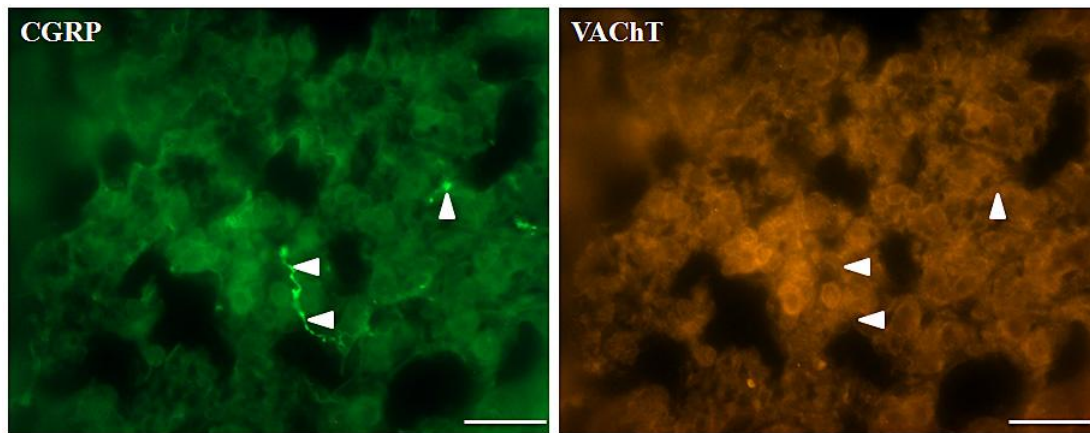


Abb. 46:

Alveolaregion, CGRP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μm

Δ =CGRP /VACHT $^{+/-}$, CGRP/VACHT $^{-/+}$ und CGRP/VACHT $^{+/+}$ Fasern wurden nicht nachgewiesen.

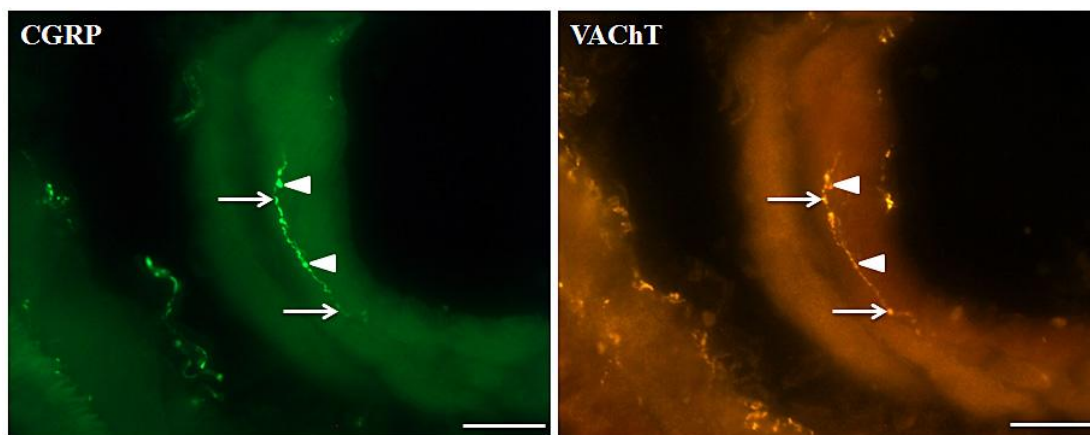


Abb. 47:

Pulmonalvene, CGRP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μm

\uparrow =CGRP/VACHT $^{-/+}$, Δ =CGRP /VACHT $^{+/-}$, CGRP/VACHT $^{+/+}$ Fasern wurden nicht nachgewiesen.

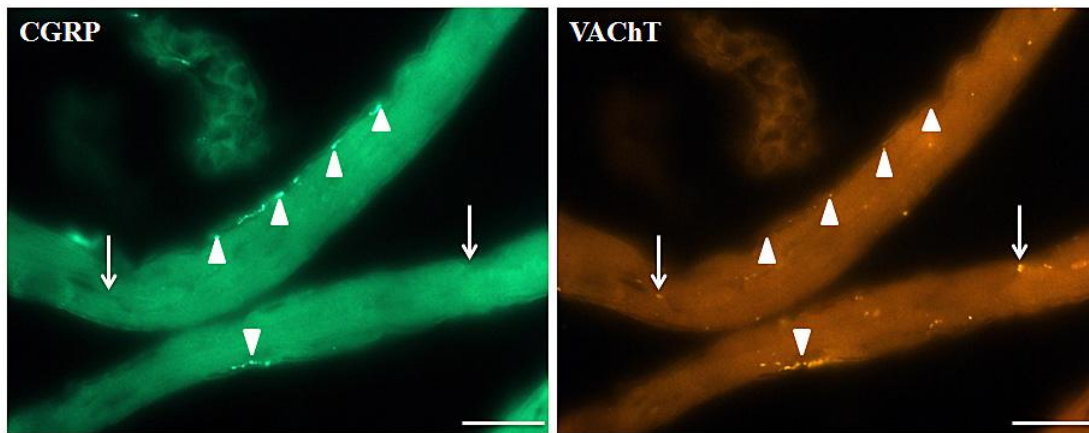


Abb. 48:

Pulmonalvene, CGRP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μm

\uparrow =CGRP/VACHT^{-/-}, Δ =CGRP/VACHT^{+/-}, CGRP/VACHT^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

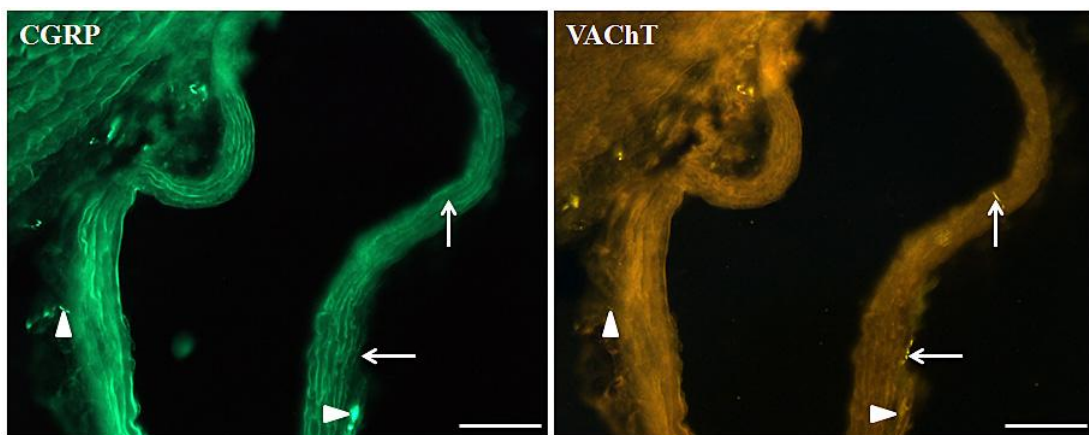


Abb. 49:

Pulmonalarterie, CGRP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μm

\uparrow =CGRP/VACHT^{-/-}, Δ =CGRP/VACHT^{+/-}, CGRP/VACHT^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

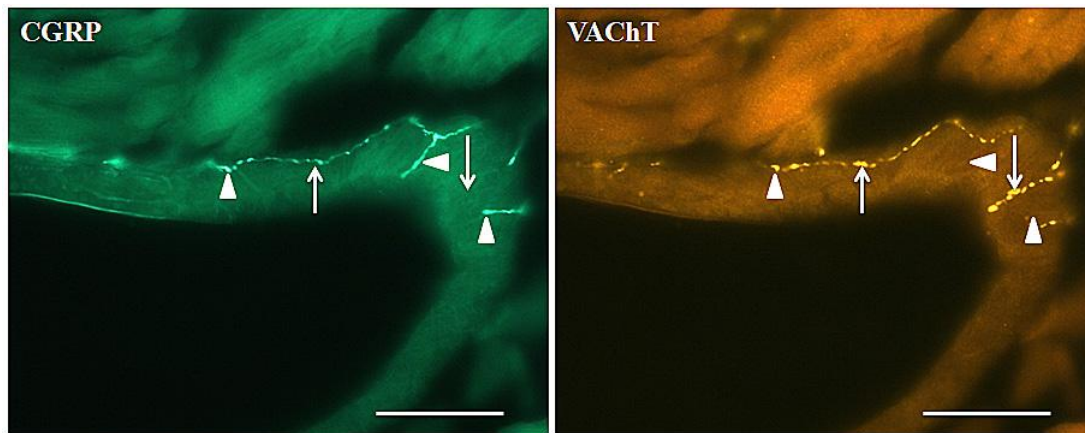


Abb. 50:

Koronararterie, CGRP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μm

↑ = CGRP/VACHT^{-/+}, Δ = CGRP/VACHT^{+/-}, CGRP/VACHT^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

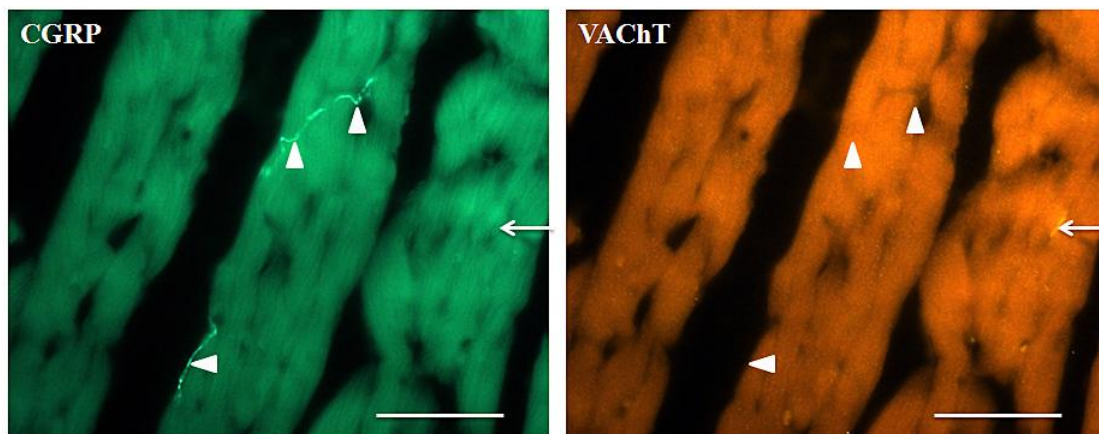


Abb. 51:

Myokard, CGRP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μm

↑ = CGRP/VACHT^{-/+}, Δ = CGRP/VACHT^{+/-}, CGRP/VACHT^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

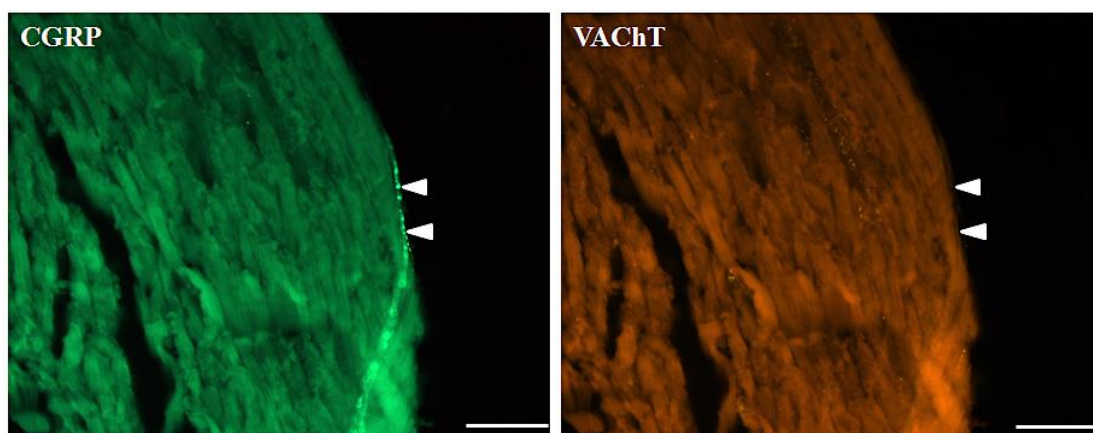


Abb. 52:

Endokard, CGRP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μm

Δ = CGRP/VACHT^{+/-}, CGRP/VACHT^{-/+} und CGRP/VACHT^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

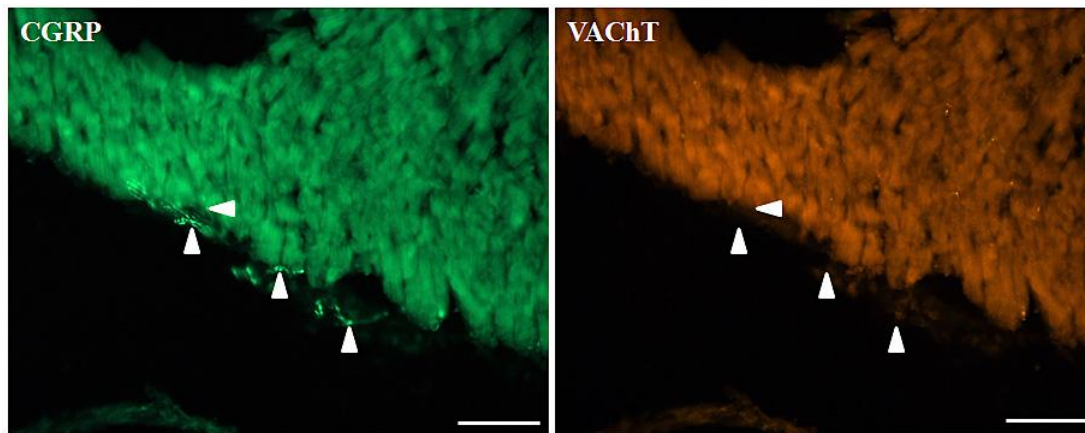


Abb. 53:

Epikard, CGRP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 µm

△ = CGRP/VACHT^{+/-}, CGRP/VACHT^{-/+} und CGRP/VACHT^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

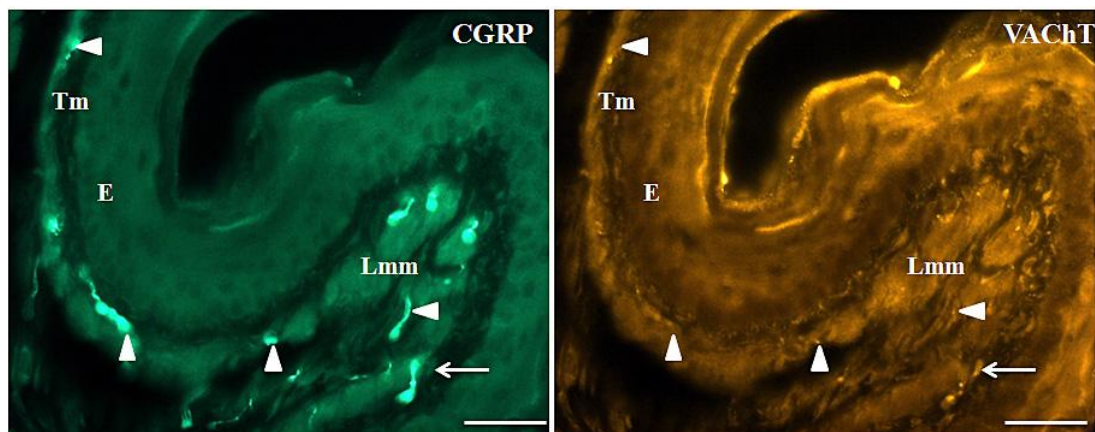


Abb. 54: Ösophagus, CGRP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 µm

↑ = CGRP/VACHT^{-/+}, △ = CGRP/VACHT^{+/-}, CGRP/VACHT^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

E = Epithel, Lmm = Lamina muscularis mucosae, Tm = Tunica muscularis

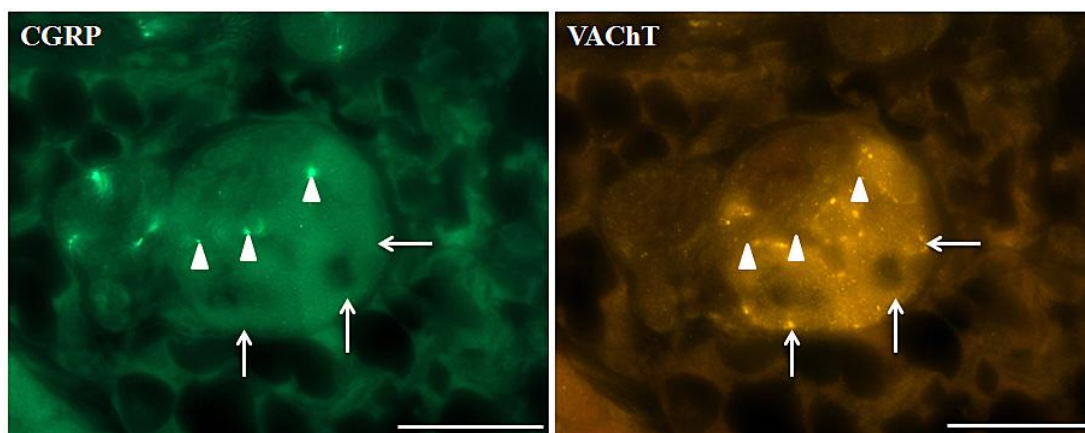


Abb. 55:

Ganglion, CGRP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 µm

↑ = CGRP/VACHT^{-/+}, △ = CGRP/VACHT^{+/-}, CGRP/VACHT^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen.

3.7 Doppelmarkierung von VAcHT und SP

3.7.1 Trachea, Lunge und Pulmonalgefäße

VAcHT/SP +/+

Dieser Fasertyp wurde in den untersuchten Gewebeschichten nicht nachgewiesen.

VAcHT/SP +/- Fasern

Dieser Fasertyp wurde bereits in den vorangehenden Kapiteln beschrieben (siehe Kapitel 3.3.1 und Kapitel 3.4.1).

VAcHT/SP -/+ Fasern

Das Epithel war nicht innerviert. In der Lamina propria der Trachea und in den Bronchioli wurden wenige immunreaktive Fasern markiert (Abb. 56, Abb. 57). Eine Innervation der glatten Muskulatur lies sich sowohl in der Muskulatur der Trachea als auch in der der Bronchi und Bronchioli beobachten, wobei die Trachealmuskulatur intensiver innerviert war (Abb. 56, Abb. 57). Immunreaktive Fasern konnten weder in der Pleura noch in der Alveolarregion nachgewiesen werden. Die Pulmonalarterien waren extrapulmonal vereinzelt innerviert, intrapulmonal zeigte sich lediglich eine punktuelle Innervation und intraazinar konnte keine Innervation beobachtet werden. Auch die Pulmonalvenen waren extrapulmonal, nicht jedoch intrapulmonal innerviert (Abb. 58).

3.7.2 Herz, Koronararterien und Ösophagus

VAcHT/SP +/+ Fasern

In den untersuchten Gewebeschichten wurde dieser Fasertyp nicht nachgewiesen.

VACHT/SP +/- Fasern

Die Beschreibung dieses Fasertyps erfolgte bereits in den vorausgegangenen Abschnitten (siehe Kapitel 3.2.2 und 3.3.2).

VACHT/ SP -/+ Fasern

In den kardialen Muskelschichten zeigte lediglich das Myokard vereinzelt immunreaktive Fasern (Abb. 61), das Epi- und Endokard hingegen waren nicht durch SP innerviert. Die Koronararterien wiesen vereinzelt SP-positive Fasern auf (Abb. 59, Abb. 60). Im Ösophagus waren alle drei Schichten innerviert, wobei die Tunica muscularis insgesamt eine geringere Innervationsdichte als die Lamina propria und die Lamina muscularis mucosae aufwies (Abb. 62).

3.7.3 Parasympathische Ganglien

Sowohl die Zellkörper als auch die Nervenfasern parasympathischer Ganglien waren VACHT-immunreaktiv. Ein Nachweis SP-positiver Fasern gelang nur in den Nervenfasern, die Zellkörper waren nicht immunreaktiv für SP (Abb. 63). Fasern, die sowohl für VACHT als auch für SP immunreaktiv waren, wurden nicht markiert.

	VChT/SP +/+	VChT/ SP +/-	VChT /SP -/+
Trachea			
- Epithel	-	-	-
- Lamina propria	-	+	+
- Glatter Muskel	-	+++	++
Lunge			
<u>Bronchi</u>			
- Epithel	-	-	-
- Lamina propria	-	++	+
- Glatter Muskel	-	+++	+
<u>Bronchioli</u>			
- Epithel	-	-	-
- Glatter Muskel	-	++	+
Alveolarregion	-	-	-
Pleura	-	-	-
<u>Pulmonalarterien</u>			
- Extrapulmonal	-	+	(+)
- Intrapulmonal	-	-	-
- Intraazinär	-	-	-
<u>Pulmonalvenen</u>			
- Extrapulmonal	-	+++	+
- Intrapulmonal	-	++	(+)
Herz			
- Epikard	-	+	-
- Myokard	-	++	+
- Endokard	-	(+)	-
- Koronararterien	-	+	+
Ösophagus			
- Lamina propria	-	+	++
- Lamina muscularis mucosae	-	+	++
- Tunica muscularis	-	++	+
Ganglien			
- Zellkörper	-	++	-
- Nervenfasern	-	+	+

Tab. 11 Innervationsdichte von VChT und SP

+++ dichte Innervation; ++ weniger dichte Innervation; + geringe Innervation; (+) vereinzelte Innervation;
- keine Innervation

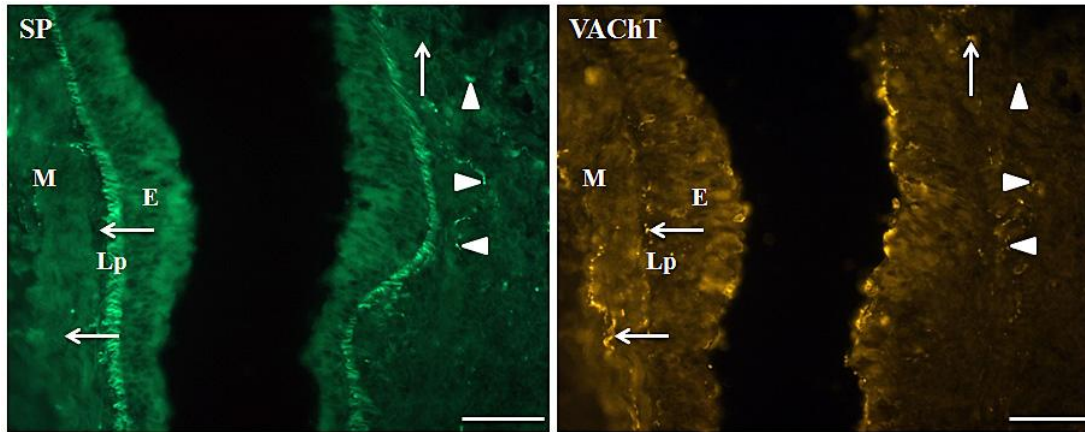


Abb. 56:

Trachea, SP/VChT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μm

Δ = SP/VChT $^{+/-}$, \uparrow = SP/VChT $^{-/+}$, SP/VChT $^{+/+}$ Fasern wurden nicht nachgewiesen.

E = Epithel, Lp = Lamina propria, M = glatte Muskulatur

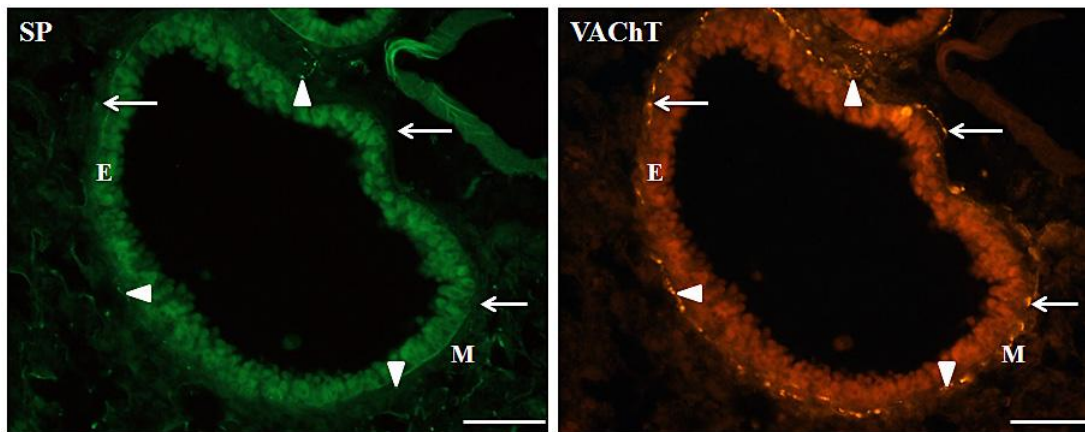


Abb. 57:

Bronchus, SP/VChT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μm

Δ = SP/VChT $^{+/-}$, \uparrow = SP/VChT $^{-/+}$, SP/VChT $^{+/+}$ Fasern wurden nicht nachgewiesen.

E = Epithel, M = glatte Muskulatur

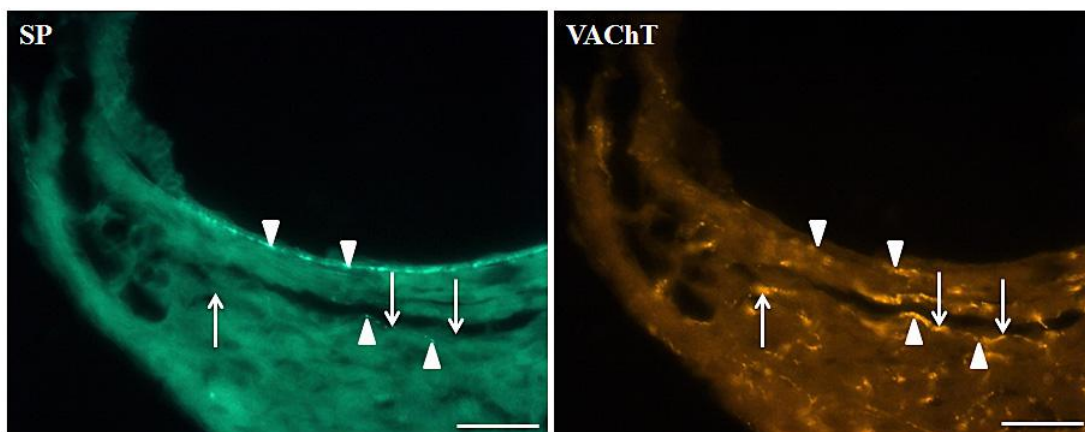


Abb. 58:

Pulmonalvene extrapulmonal, SP/VChT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μm

Δ = SP/VChT $^{+/-}$, \uparrow = SP/VChT $^{-/+}$, SP/VChT $^{+/+}$ Fasern wurden nicht nachgewiesen.

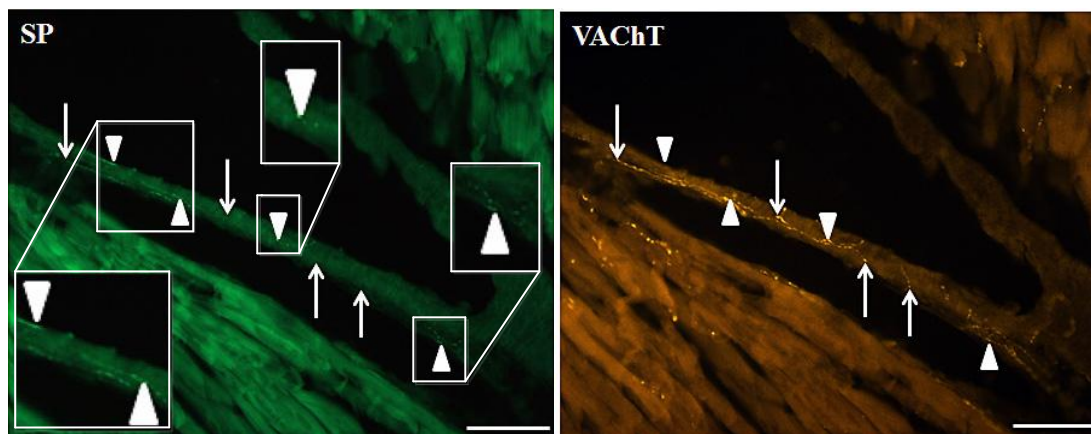


Abb. 59:

Koronararterie, SP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μ m

Δ = SP/VACHT^{+/+}, \uparrow = SP/VACHT^{-/+}, SP/VACHT^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen. Zur besseren Darstellung sind immunreaktive Fasern im Bildausschnitt links vergrößert dargestellt.

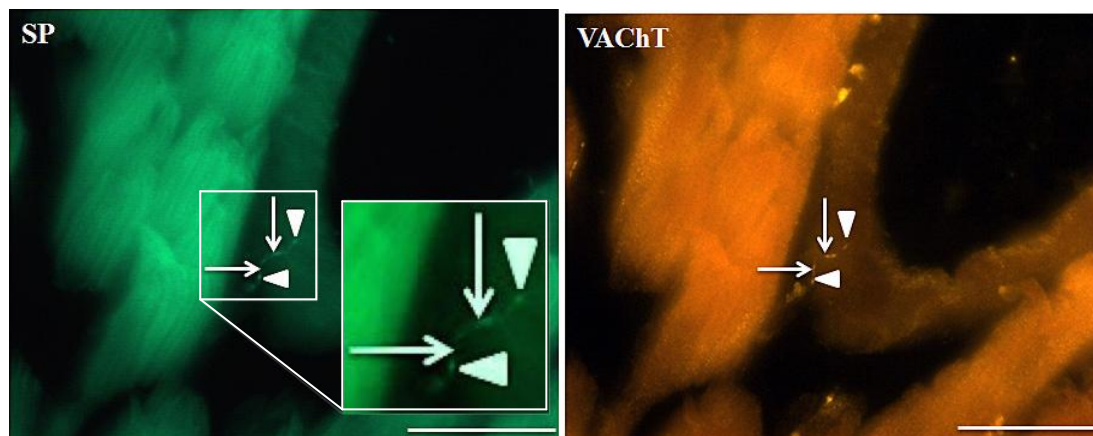


Abb. 60:

Koronararterie, SP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μ m

Δ = SP/VACHT^{+/+}, \uparrow = SP/VACHT^{-/+}, SP/VACHT^{+/+} Fasern wurden nicht nachgewiesen. Zur besseren Darstellung sind immunreaktive Fasern im Bildausschnitt links vergrößert dargestellt.

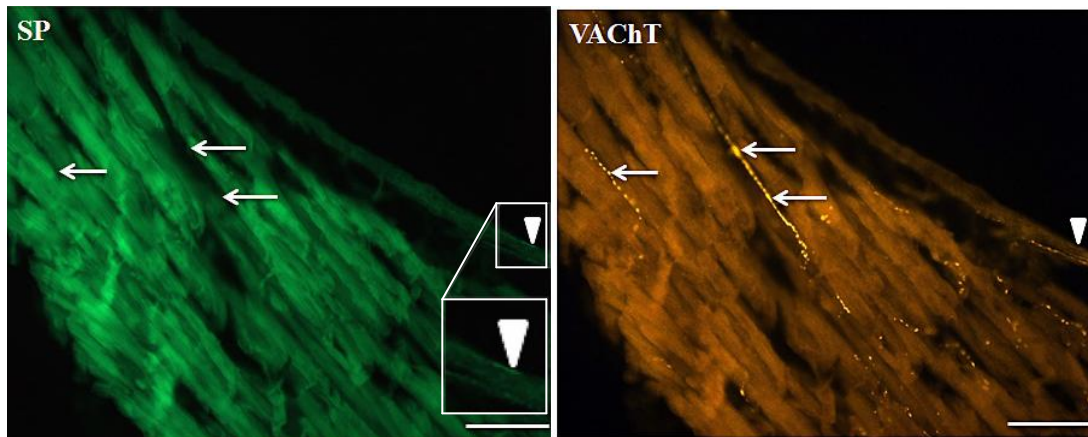


Abb. 61:

Myokard, SP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μm

Δ = SP/VACHT $^{+/-}$, \uparrow = SP/VACHT $^{-/+}$, SP/VACHT $^{+/+}$ Fasern wurden nicht nachgewiesen. Zur besseren Darstellung sind immunreaktive Fasern im Bildausschnitt links vergrößert dargestellt.

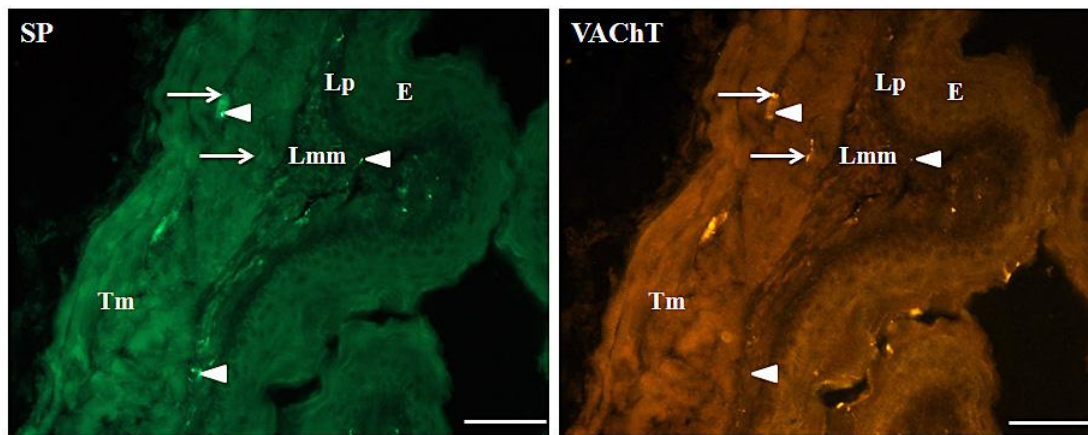


Abb. 62:

Ösophagus, SP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μm

Δ = SP/VACHT $^{+/-}$, \uparrow = SP/VACHT $^{-/+}$, SP/VACHT $^{+/+}$ Fasern wurden nicht nachgewiesen.

E = Epithel, Lp = Lamina propria, Lmm = Lamina muscularis mucosae, Tmm = Tunica muscularis mucosae

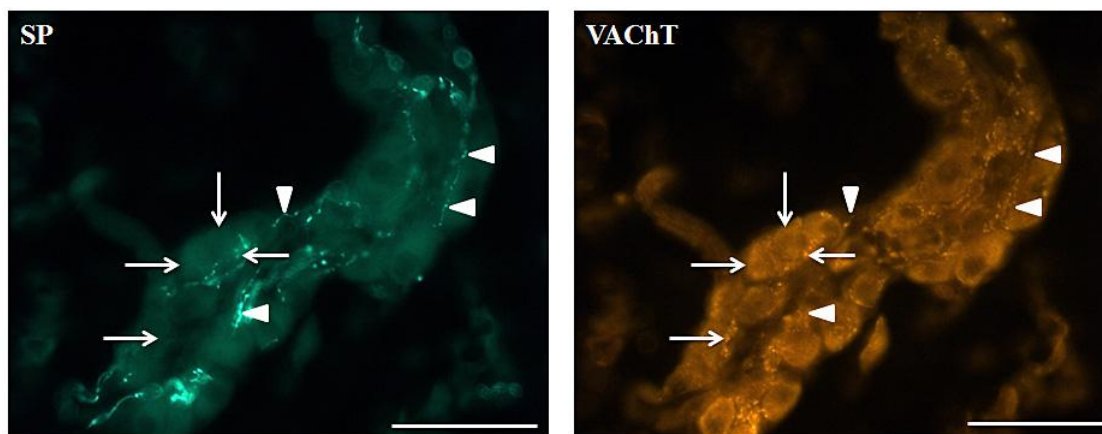


Abb. 63:

Ganglion, SP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz, Maßstab 50 μm

Δ = SP/VACHT $^{+/-}$, \uparrow = SP/VACHT $^{-/+}$, SP/VACHT $^{+/+}$ Fasern wurden nicht nachgewiesen.

3.8 Darstellung der Stickstoffoxidsynthese durch die NADPH-Diaphorase-Reaktion in den Brustraumorganen

3.8.1 Trachea, Lunge und Pulmonalgefäße

In der glatten Muskulatur der Trachea konnten NADPH-positive Fasern dargestellt werden und das Trachealepithel zeigte eine positive Reaktion für NADPH-Diaphorase-Aktivität (Abb. 77). Das respiratorische Epithel der Bronchien zeigte sowohl in den kleinen als auch in den großen Bronchien eine positive NADPH-Diaphorase Reaktion (Abb. 75, Abb. 76). NADPH-positive Fasern konnten in der glatten Muskulatur der Bronchien, nicht aber in der der Bronchioli nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Lamina propria wurden in der glatten Muskulatur mehr NADPH-positive Fasern markiert. In den Lungenarterien wurden einige NADPH-positive Fasern nachgewiesen, hauptsächlich jedoch zeigte sich eine ausgeprägte NADPH-Diaphorase-Reaktion des Endothels (Abb. 75). Auch in den Pulmonalvenen wiesen einige Nervenfasern eine positive NADPH-Diaphorase-Reaktion auf (Abb. 74).

3.8.2 Herz, Aorta und Ösophagus

Sowohl im Epi-, Myo- als auch im Endokard konnten NOS-positive Fasern dargestellt werden, auch die Koronararterien zeigten eine positive Reaktion im Endothel (Abb. 68, Abb. 69, Abb. 70, Abb. 71, Abb. 73). In allen Schichten des Ösophagus wurden positive Fasern nachgewiesen, wobei die Dichte in der Lamina propria verglichen mit der Lamina muscularis mucosae und der Tunica muscularis deutlich geringer war (Abb. 64, Abb. 65, Abb. 66, Abb. 67).

3.8.3 Parasympathische Ganglien

Eine positive NADPH-Diaphorase-Reaktion wurden in den parasympathischen Ganglien an den Atemwegen nicht nachgewiesen. In einigen Neuronen kardialer Ganglien und in Ganglien des Ösophagus konnte jedoch eine positive NOS-Reaktion

dargestellt werden, einige Fasern zeigten sich ebenfalls immunreaktiv für NOS (Abb. 65, Abb. 66, Abb. 68, Abb. 69, Abb. 72).

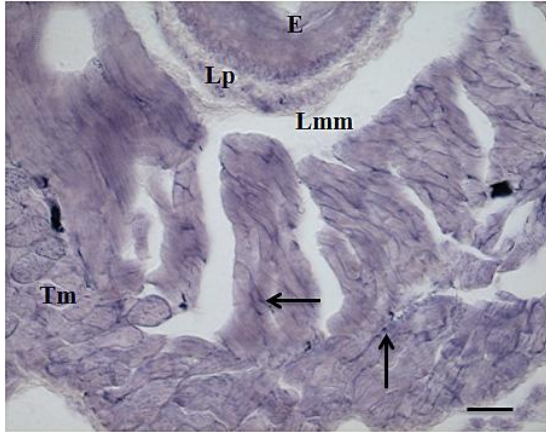


Abb. 64:

Ösophagus, NADPH-Diaphorase-Reaktion, Maßstab 50 µm

E = Epithel, Lp = Lamina propria, Lmm = Lamina muscularis mucosae, Tm = Tunica muscularis, → markiert positive Nervenfasern

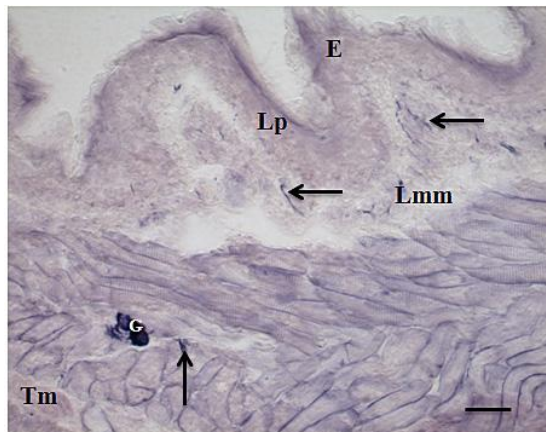


Abb. 65:

Ösophagus, NADPH-Diaphorase-Reaktion, Maßstab 50 µm

E = Epithel, Lp = Lamina propria, Lmm = Lamina muscularis mucosae, Tm = Tunica muscularis, G = Ganglienzellkörper, → markiert positive Nervenfasern

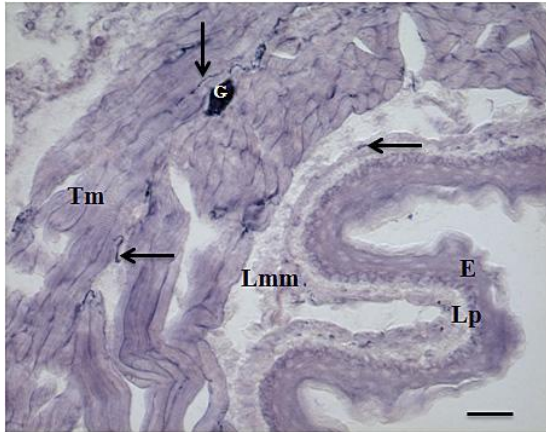


Abb. 66:

Ösophagus, NADPH-Diaphorase-Reaktion, Maßstab 50 µm

E = Epithel, Lp = Lamina propria, Lmm = Lamina muscularis mucosae, Tm = Tunica muscularis, G = Ganglienzellkörper, → markiert positive Nervenfasern

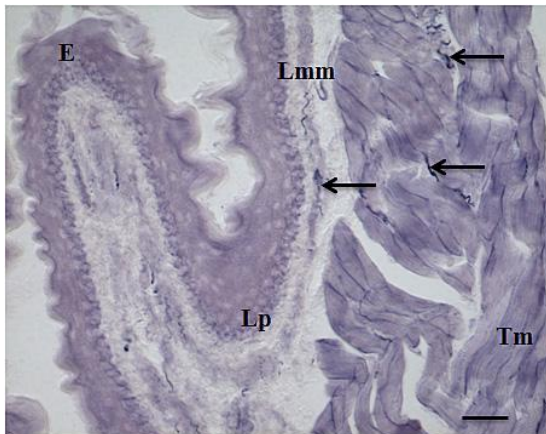


Abb. 67:

Ösophagus, NADPH-Diaphorase-Reaktion, Maßstab 50 µm

E = Epithel, Lp = Lamina propria, Lmm = Lamina muscularis mucosae, Tm = Tunica muscularis, → markiert die positive Nervenfasern

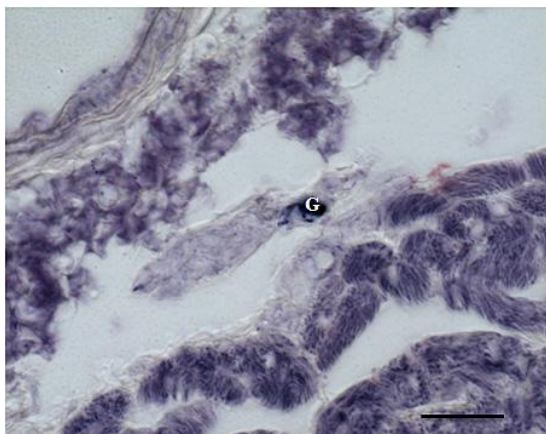


Abb. 68: Myokard, NADPH-Diaphorase-Reaktion, Maßstab 50 µm

G = Ganglienzellkörper, → markiert positive Nervenfasern

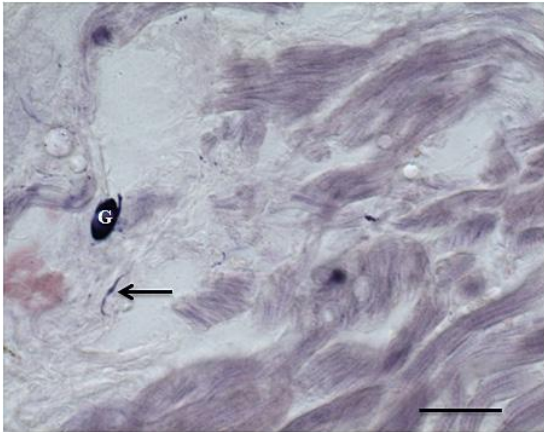


Abb. 69: Myokard, NADPH-Diaphorase-Reaktion, Maßstab 50 μm
G = Ganglienzellkörper, \rightarrow markiert positive Nervenfasern

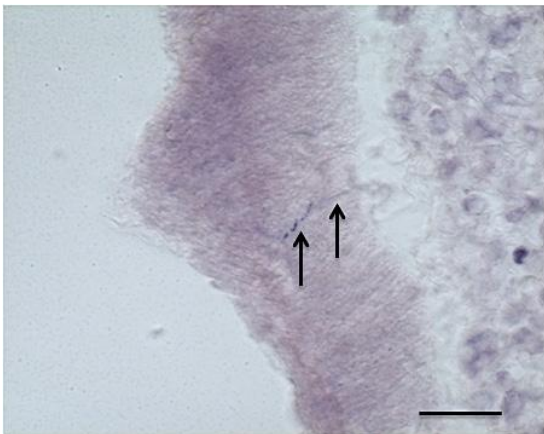


Abb. 70:
Epikard, NADPH-Diaphorase-Reaktion, Maßstab 50 μm , \rightarrow markiert positive Nervenfasern



Abb. 71:
Epi-, Myo- und Endokard, NADPH-Diaphorase-Reaktion, Maßstab 50 μm

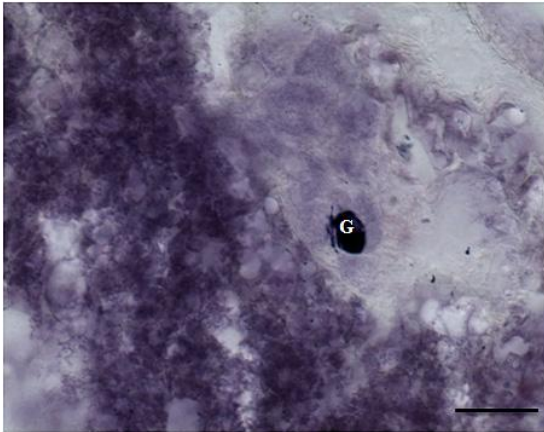


Abb. 72:
Kardiales Ganglion mit Ganglienzellkörper, NADPH-Diaphorase-Reaktion, Maßstab 50 μm
G = Ganglienzellkörper

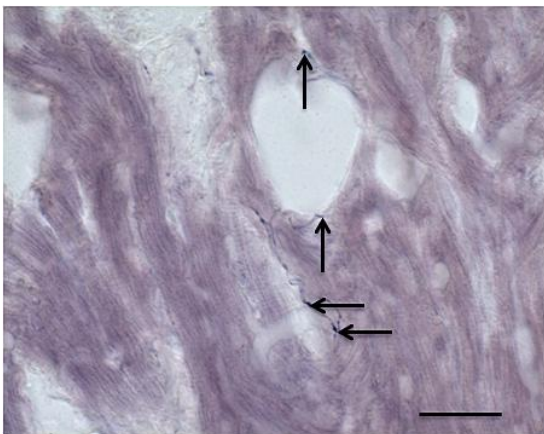


Abb. 73:
Koronararterie, NADPH-Diaphorase-Reaktion, Maßstab 50 μm , \longrightarrow markiert positive Nervenfasern

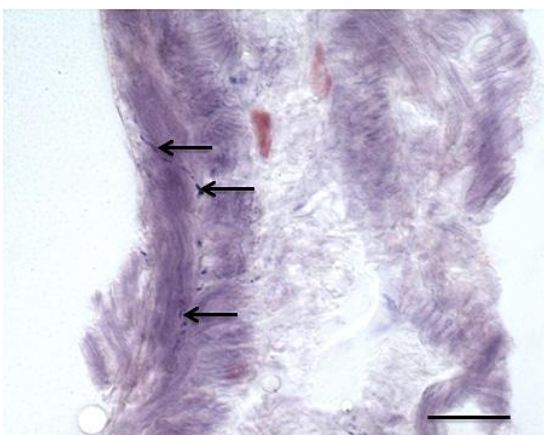


Abb. 74:
Pulmonalvene, NADPH-Diaphorase-Reaktion, Maßstab 50 μm , \longrightarrow markiert positive Nervenfasern

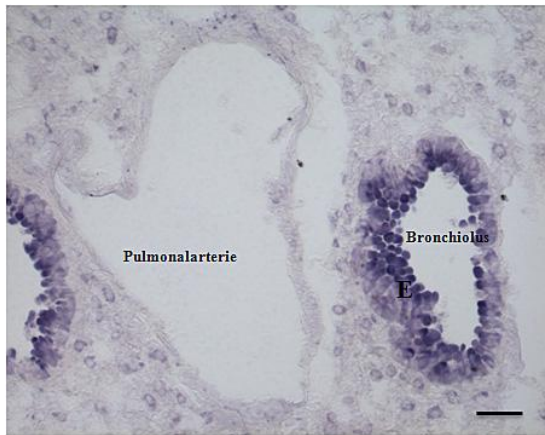


Abb. 75:
Bronchiolus, NADPH-Diaphorase-Reaktion, Maßstab 50 μ m
E= Epithel, \rightarrow markiert positives Bronchialepithel

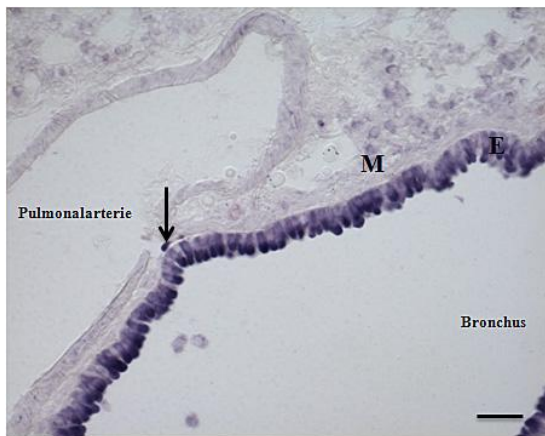


Abb. 76:
Bronchus, NADPH-Diaphorase-Reaktion, Maßstab 50 μ m
E= Epithel , M= glatter Muskel, \rightarrow markiert positives Bronchialepithel

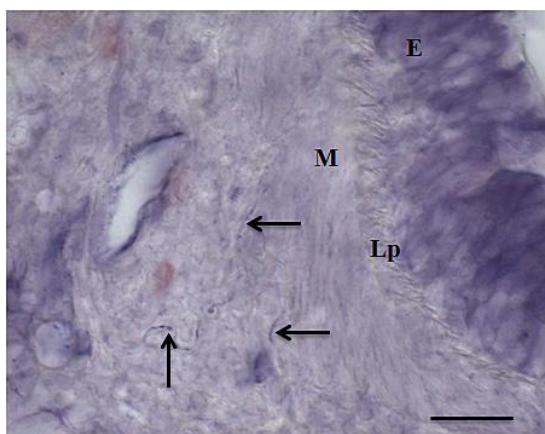


Abb. 77:
Trachea, NADPH-Diaphorase-Reaktion, Maßstab 50 μ m
E = Epithel, M = glatter Muskel, Lp = Lamina propria, \rightarrow markiert positives Bronchialepithel

4. Diskussion

Der Schwerpunkt der vorliegenden Diskussion liegt auf der Innervation des Respirationstraktes. Ergänzend wurden Befunde zur Innervation des Herzens erhoben, wobei keine Unterscheidung zwischen rechtem und linkem Herzen oder zwischen Vorhof und Kammer getroffen wurde. Von Interesse war hierbei die Innervation der Herzmuskelschichten und der Koronargefäße. Die Analyse der Innervation des Ösophagus diente aufgrund der bekannten Reaktion als Positivkontrolle und wird nur in Bezug zur Innervation des Respirationstraktes näher diskutiert.

4.1 Innervationsdichte cholinерger Fasern

Um die Innervation des Respirationstraktes durch cholinerge Fasern zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine histochemische Darstellung der AChE bei gleichzeitiger Markierung der glatten Muskulatur mit Hilfe eines Antikörpers gegen glattemuskuläres α -Aktin an der Mauslunge angewandt. Dabei zeigte sich, dass cholinerge Nervenfasern in der Lamina propria und in der glatten Muskulatur großer Bronchien bis in die Bronchioli zu finden waren und das respiratorische Epithel nicht durch cholinerge Fasern versorgt wurde. Die größte Innervationsdichte wiesen Bronchien mit einem Durchmesser unter 100 μm auf. El-Bermani et al. konnten am Rhesus-Affen eine cholinerge Innervation der glatten Muskulatur und der Lamina propria größerer Bronchien bis in die Bronchioli mit von proximal nach distal abnehmender Innervationsdichte darstellen (El-Bermani and Grant, 1975; El-Bermani et al., 1982). Die größte Dichte AChE-positiver Fasern zeigte sich dabei an den Bifurkationspunkten des Bronchialbaumes (El-Bermani und Grant, 1975). Entgegen den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnten am Rhesus-Affen jedoch cholinerge Fasern im Epithel markiert werden (El-Bermani und Grant, 1975; El-Bermani et al., 1982). In Untersuchungen am Hund wurden AChE-haltige Fasern in der Alveolarregion nachgewiesen (Hirsch und Kaiser, 1969), was in der vorliegenden Arbeit an der Maus nicht gelang. Das Verteilungsmuster cholinерger Fasern im bronchialen System und die Erkenntnis, dass der Respirationstrakt nicht in jedem Abschnitt dieselbe Innervationsdichte cholinерger Fasern enthält, ist wichtig für das Verständnis pathophysiologischer Vorgänge chronisch-entzündlicher Lungenerkrankungen wie

Asthma bronchiale oder COPD. Durch hypoxische Reflexe bewirken cholinerge perimuskuläre Fasern eine Bronchokonstriktion (Delpierre et al., 1980; Nadel und Widdicombe, 1962) und führen zu Umbauvorgängen des Lungengewebes im Rahmen der Inflammation (Gosens et al., 2006).

4.2 Die Innervation des Respirationstrakts und der Pulmonalgefäße

4.2.1 PGP 9.5-immunreaktive Fasern

Im Rahmen der Untersuchungen der hier vorliegenden Arbeit konnten PGP 9.5-immunreaktive Fasern in der Trachea, der glatten Muskulatur der intra- und extrapulmonalen Atemwege, sowie vereinzelt in der Pleura und Alveolarregion nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse entsprechen früheren Publikationen (Kusindarta et al., 2004; Larson et al., 2003; Weichselbaum et al., 1996). Dabei zeigten sich immunreaktive Fasern in der Trachea und den intra- und extrapulmonalen Bronchi in ihrer stärksten Ausprägung in der glatten Muskulatur und schwächer werdend in der Lamina propria. Auch die glatte Muskulatur der Bronchioli war durch PGP 9.5-immunreaktive Fasern innerviert, jedoch weniger intensiv verglichen mit Trachea und Bronchi. Wie bereits Larson et al. 2003 nachweisen konnten, fiel auch hier eine abnehmende Nervenfaserdichte von proximal nach distal auf. Anders als in vorangegangenen Studien (Larson et al., 2003) konnte keine Innervation des respiratorischen Epithels nachgewiesen werden. Der Nachweis PGP 9.5-immunreaktiver Fasern in der Alveolarregion, der erstmals durch Springall et al. 1990 an der Ratte erbracht wurde, kann durch diese Arbeit an der Maus bestätigt werden. In früheren Arbeiten zeigten parasymphatische thorakale Ganglien sowohl intra- als auch extrapulmonal eine Immunreaktivität für PGP 9.5 (Canning und Fischer, 1997; Kusindarta et al., 2004), was sich auch in unseren Untersuchungen reproduzieren ließ. Innerhalb thorakaler Ganglien zeigten sich nur vereinzelt nicht-cholinerge PGP 9.5-positive Fasern, während cholinerge Fasern reichlich vorhanden waren. Die pulmonalen Arterien und Venen wurden sowohl intra- als auch extrapulmonal durch PGP 9.5-positive Fasern innerviert. Hierbei fiel auf, dass die Venen stärker durch PGP 9.5-immunreaktive Fasern innerviert wurden als die Arterien, dabei ließ sich extrapulmonal eine leicht höhere Innervationsdichte beobachten. Diese Beobachtungen entsprechen den Ergebnissen vorangegangener Studien (Kusindarta et al., 2004).

Insgesamt ließ sich mit Ausnahme des respiratorischen Epithels eine Immunreaktivität für PGP 9.5 in Nervenfasern aller untersuchter Gewebeschichten nachweisen. Durch die Verwendung dieses generellen Neuronen-spezifischen Markers konnte zunächst die Gesamtnnervation der thorakalen Organe dargestellt werden.

4.2.2 VACHT-immunreaktive Nervenfasern

In der vorliegenden Arbeit ließen sich VACHT-immunreaktive Fasern in der gesamten glatten Muskulatur von Trachea bis in die Bronchiolen nachweisen. Die Lamina propria war weniger dicht innerviert und im respiratorischen Epithel konnte keine Immunreaktion beobachtet werden. Dies entspricht den Ergebnissen vorangegangener Studien (Canning und Fischer, 1997; Kusindarta et al., 2004; Weichselbaum et al., 1996). Die Innervationsdichte nahm von proximal nach distal ab. Eine Innervation der Pleura oder der Alveolarregion lag nicht vor. In ihren Untersuchungen an der Meerschweinchenlunge 1997 gelang es Canning und Fischer ebenfalls nicht, eine cholinerge Innervation der Alveolen nachzuweisen (Canning und Fischer, 1997). Jedoch konnten die Autoren, genauso wie Kusindarta et al. 2004, eine Immunreaktion für VACHT in parasympathischen lokalen Atemwegsganglien darstellen und cholinerge Nervenfasern innerhalb der Ganglien markieren. Die Ergebnisse der Untersuchungen an der Mauslunge im Rahmen dieser Arbeit stimmen hiermit überein.

Für intra- und extrapulmonale Venen konnte eine Innervation durch cholinerge Fasern nachgewiesen werden, dabei war eine erhöhte Nervenfaserdichte in den extrapulmonalen Venen auffallend. Pulmonale Arterien hingegen zeigten keine Immunreaktivität für VACHT. Im Gegensatz zu diesem Ergebnis konnten Haberberger et al. 1997 an ihren Untersuchungen an der Meerschweinchenlunge eine Immunreaktion für VACHT der extra- und intrapulmonalen Arterien bis zu einem Durchmesser von 50 µm nachweisen. Auch pulmonale Venen mit einem Durchmesser von 350 µm bis über 700 µm zeigten in dieser Studie eine cholinerge Innervation (Haberberger et al., 1997). VACHT-positive Nervenfasern, die extrapulmonale Blutgefäße der Ratte innervierten, konnten durch Kusindarta et al. 2004 nachgewiesen werden.

Vorangegangene Arbeiten zeigten, dass die cholinergen Nervenfasern der Atemwege lokalen Atemwegsneuronen entstammen, die entlang der Lungenhili und der

extrapulmonalen Bronchien nachgewiesen werden konnten (Canning und Fischer, 1997). Diese Fasern enthielten weitere Transmittersubstanzen, die neben VACHT eine Immunreaktivität für VIP oder NPY aufwiesen. In unseren Studien konnten wir entgegengesetzt zu diesen Ergebnissen keine VACHT/VIP +/+ Fasern markieren, es gelang jedoch der Nachweis NPY-immunreaktiver Fasern in Zellkörpern lokaler Atemwegsganglien. Ein gemeinsames Vorkommen von VACHT und NPY außerhalb der Nervenzellkörper wurde nur um extrapulmonale Pulmonalvenen beobachtet. Koexpression von anderen untersuchten Peptiden oder Transmittersyntheseenzymen, wie SP, CGRP oder TH mit VACHT wurden nicht nachgewiesen, dies entspricht auch den Ergebnissen von Kusindarta et al. 2004. Hieraus lässt sich schließen, dass die übrigen Substanzen unabhängig vom cholinergen System ausgeschüttet werden und es demzufolge ein eigenständiges System geben muss, welches neben dem bekannten cholinergen System besteht.

4.2.3 VIP-immunreaktive Nervenfasern

Die Untersuchungen an der Mauslunge im Rahmen dieser Arbeit zeigten eine Innervation der Atemwegsmuskulatur mit VIP-immunreaktiven Fasern. Insgesamt konnte eine spärliche Innervation der glatten Muskulatur der Trachea und Bronchi nachgewiesen werden, die glatte Muskulatur der Bronchioli war nicht durch VIP-positive Fasern innerviert. Die Innervationsdichte der trachealen und bronchialen Muskulatur war annähernd gleich. In der Lamina propria der Trachea, Bronchi und Bronchioli konnte keine Immunreaktivität für VIP nachgewiesen werden. Auch das respiratorische Epithel war nicht innerviert. Die Pleura und das Alveolarparenchym enthielten keine VIP-positiven Fasern. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen zeigten Kummer et al. 1992 in ihren Studien am Meerschweinchen eine dichte Innervation der glatten Muskulatur der Trachea und Bronchi durch VIP-immunreaktive Fasern, von denen die meisten gleichzeitig immunreaktiv für NPY waren. Es fiel eine höhere Innervationsdichte in der trachealen als in der bronchialen Muskulatur auf, zusätzlich gelang der Nachweis einiger immunreaktiver Nervenfasern in der trachealen Lamina propria. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen konnten auch Kummer et al. keine VIP-immunreaktiven Fasern in der Lamina propria und der glatten Muskulatur der kleineren Bronchi und in der Alveolarregion nachweisen. Auch das respiratorische

Epithel war nicht durch VIP-positive Fasern innerviert (Kummer et al., 1992). Im Gegensatz hierzu konnten im Trachealepithel des Frettchens VIP-immunreaktive Fasern dargestellt werden (Dey et al., 1999). Kummer et al. konnten 1992 am Meerschweinchen VIP-immunreaktive Nervenfasern innerhalb der trachealen und peribronchialen Ganglien nachweisen, eine Immunreaktivität der Nervenzellkörper ließ sich jedoch nicht beobachten. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnte weder eine Immunreaktivität intraganglionärer Nervenfasern, noch der Nervenzellkörper nachgewiesen werden. In vorangegangenen Studien wurden durch retrograde Markierungen Sympathikus- und Ösophagusneurone als Ursprung VIP-immunreaktiver Fasern identifiziert (Bowden and Gibbins, 1992; Fischer et al., 1998; Kummer et al., 1992b; Moffatt et al., 1998).

Anders als in vorangegangenen Studien (Kummer et al., 1992b; Kusindarta et al., 2004; Martling et al., 1990) konnte in dieser Arbeit an der Maus keine Innervation der intra- oder extrapulmonalen Arterien durch VIP nachgewiesen werden. Die intra- und extrapulmonalen Venen enthielten hingegen wenige VIP-immunreaktive Fasern in nahezu gleicher Innervationsdichte. In früheren Studien konnte eine Innervation extrapulmonaler Lungenvenen der Ratte (Kusindarta et al., 2004) und des Meerschweinchens (Kummer et al., 1992b) beobachtet werden, die intrapulmonalen Venen waren in derselben Untersuchung am Meerschweinchen nicht durch VIP-positive Fasern innerviert.

Entgegengesetzt zu den Beobachtungen von Kusindarta et al. 2004 konnte in der vorliegenden Arbeit in keinem der untersuchten Gewebe ein gemeinsames Vorkommen von VIP und VAcHT nachgewiesen werden, was vermuten lässt, dass die Innervation der untersuchten VIP-haltigen Organe nicht-cholinerg ist.

4.2.4 NPY-immunreaktive Fasern

Im gesamten tracheo-bronchialen System ließen sich in der glatten Muskulatur NPY-positive Nervenfasern ohne Unterschiede in der Innervationsdichte nachweisen. In der trachealen Lamina propria konnten vereinzelt immunreaktive Fasern nachgewiesen werden, dieser Nachweis gelang in den Bronchi nicht. Dies entspricht den Ergebnissen früherer Studien (Kummer et al., 1992b; Kusindarta et al., 2004). Dabei enthielten

einige NPY-immunreaktive Fasern innerhalb der glatten Muskulatur und der Lamina propria der Atemwege des Meerschweinchens auch TH (Kummer et al., 1992b). Die Lamina propria wurde verglichen mit der glatten Muskulatur weniger dicht von immunreaktiven Fasern durchzogen (Kummer et al., 1992b). Kusindarta et al. zeigten in ihrer Arbeit 2004 ein gemeinsames Vorkommen von NPY und VIP in einigen Fasern der glatten Muskulatur, nicht jedoch in der Lamina propria. Zusätzlich wurden in der Lamina propria und der glatten Muskulatur der Ratte Fasern nachgewiesen, die sowohl für NPY als auch für ChAT immunreaktiv waren (Kusindarta et al., 2004). Der Nachweis von VACHT/NPY $+/+$ Fasern in der Lamina propria oder der glatten Muskulatur gelang in dieser Arbeit in der Maus nicht. In neuronalen Tracingstudien wurden beim Meerschweinchen sympathische Ganglien als Ursprung der NPY-Fasern identifiziert (Bowden and Gibbins, 1992; Kummer et al., 1992b). Martling et al. konnten in Untersuchungen am Schwein den Ursprung NPY-immunreaktiver Fasern zur Innervation der glatten Atemwegsmuskulatur in parasymphischen lokalen Atemwegsganglien nachweisen (Martling et al., 1990). In der vorliegenden Arbeit konnten intraganglionär NPY-positive Fasern nachgewiesen werden, Fasern, die gleichzeitig für VACHT und NPY immunreaktiv waren, wurden hingegen nicht beobachtet. Rein NPY-positive Zellkörper kamen nicht vor, es bestand stets eine gleichzeitige Immunreaktion für VACHT und NPY, was auch den Ergebnissen früherer Studien entspricht (Kusindarta et al., 2004). Kummer et al. konnten in ihren Untersuchungen am Meerschweinchen NPY-immunreaktive Fasern in der Alveolarregion nachweisen (Kummer et al., 1992b). Dieser Nachweis gelang bei der Maus im Rahmen dieser Arbeit nicht.

In extra- und intrapulmonalen Venen und Arterien wurde eine Innervation durch NPY-positive Fasern nachgewiesen. Ein Unterschied in der Innervationsdichte wurde nicht beobachtet. Kummer et al. zeigten in früheren Untersuchungen, dass die an der Gefäßinnervation beteiligten Fasern neben NPY überwiegend auch TH enthielten und postganglionären sympathischen Ursprungs waren. Des Weiteren gäbe es noch NPY-positive Fasern, deren Ursprung nicht-adrenerge Sympathikusneurone seien (Kummer et al., 1992b). Für die rein NPY-positiven Nervenfasern, die in vorangegangenen Studien nachgewiesen wurden, diskutierten Fischer et al. den Ursprung in intrinsischen Ösophagusneuronen (Fischer et al., 1998). Vergleichend mit den Untersuchungen von Kusindarta et al., die ein gemeinsames Vorkommen von VACHT und NPY innerhalb intra- und extrapulmonaler Venen beschrieben (Kusindarta et al., 2004), konnten in den

Untersuchungen der vorliegenden Arbeit Kolokalisationen von VAcHT und NPY vereinzelt um extrapulmonale Venen sowie innerhalb intraganglionärer Zellkörper nachgewiesen werden. VAcHT/NPY +/- Fasern um intrapulmonale Venen hingegen ließen sich nicht beobachten. Hieraus lässt sich schließen, dass die Freisetzung von NPY überwiegend aus eigenständigen nicht-cholinergen Fasern erfolgt.

4.2.5 TH-immunreaktive Fasern

In der glatten Atemwegsmuskulatur waren TH-immunreaktive Fasern von der Trachea bis in die Bronchioli terminales in von proximal nach distal abnehmender Innervationsdichte darzustellen. Die Lamina propria und das respiratorische Epithel waren nicht innerviert. Kusindarta et al. konnten im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit in ihren Studien an der Ratte keine Innervation der Atemwegsmuskulatur durch TH-immunreaktive Fasern nachweisen. Entsprechend unseren Ergebnissen zeigte sich in ihrer Arbeit ebenfalls keine Immunreaktivität im respiratorischen Epithel und der Lamina propria (Kusindarta et al., 2004). Entgegen den Ergebnissen von Kummer et al. beim Meerschweinchen konnten keine TH-immunreaktiven Fasern im Alveolarparenchym nachgewiesen werden (Kummer et al., 1992b).

Eine Innervation der extrapulmonalen, nicht aber der intrapulmonalen Arterien konnte in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden, während die Venen sowohl intra- als auch extrapulmonal innerviert wurden, wobei von proximal nach distal eine abnehmende Innervationsdichte auffiel. In vorangegangenen Studien wurde ebenfalls eine noradrenerge perivaskuläre Innervation nachgewiesen, im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen wurden TH-positive Fasern auch an intrapulmonalen Arterien beobachtet (Haberberger et al., 1997; Kummer et al., 1992b; Kusindarta et al., 2004). Dabei konnten Haberberger et al. am Meerschweinchen nachweisen, dass Pulmonalarterien mit einem Durchmesser von 100 µm bis über 700 µm von TH-positiven Fasern versorgt wurden (Haberberger et al., 1997). Zusätzlich wurde an Lungenarterien das Vorkommen TH/NPY +/- Fasern beobachtet (Kummer et al., 1992b). Die Innervationsdichte der Lungenvenen nahm mit zunehmendem Durchmesser zu (Haberberger et al., 1997) und auch hier wurden TH/NPY +/- Fasern nachgewiesen (Kummer et al., 1992b).

Intraganglionär konnten in der vorliegenden Arbeit TH-positive Nervenfasern nachgewiesen werden, während die Nervenzellkörper keine Immunreaktivität für TH zeigten. Im Gegensatz hierzu wiesen Kummer et al. nicht nur immunreaktive Nervenfasern, sondern auch immunreaktive Zellkörper in lokalen Atemwegsganglien des Meerschweinchens nach. Zusätzlich konnte neben TH in einigen Nervenfasern auch NPY beobachtet werden. Diese sympathischen Fasern haben ihren Ursprung im Ganglion cervicale superius, Ganglion stellatum und den oberen thorakalen Grenzstrangganglien. Auch das Ganglion nodosum und das Ganglion jugulare enthielten als vagale sensorische Ganglien TH (Kummer et al., 1992b).

Ein gemeinsames Vorkommen von TH und VACHT ließ sich in keinem der untersuchten Gewebeabschnitte beobachten.

4.2.6 CGRP-immunreaktive Fasern

CGRP-immunreaktive Fasern fanden sich in der glatten Muskulatur des tracheobronchialen Systems sowie in der Lamina propria der Trachea. In der bronchialen Lamina propria sowie im respiratorischen Epithel konnte in der vorliegenden Arbeit der Nachweis CGRP-positiver Fasern nicht erbracht werden. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen dokumentierten Kusindarta et al. CGRP-immunreaktive Fasern im respiratorischen Epithel sowie in der bronchialen und trachealen Lamina propria des Meerschweinchens. Die Innervation der glatten Muskulatur konnte bestätigt werden, wobei die Lamina propria im Vergleich zur Muskulatur eine höhere Innervationsdichte aufwies (Kusindarta et al., 2004). Auffallend war das gleichzeitige Vorkommen von SP im großen Teil der CGRP-positiven Fasern, wobei auch nur rein CGRP-immunreaktive Fasern nachgewiesen werden konnten (Kusindarta et al., 2004). Diese Ergebnisse an der Ratte entsprechen auch den Untersuchungsergebnissen am Meerschweinchen durch Kummer et al., 1992. Die höchste Innervationsdichte an SP- und CGRP-immunreaktiven Fasern zeigte sich in den großen Bronchien (Kummer et al., 1992b), was auch in unseren Untersuchungen bestätigt wurde. Insgesamt konnten wir in den untersuchten Gewebeabschnitten eine ähnliche Verteilung von SP- und CGRP-immunreaktiven Fasern beobachten.

Entsprechend früheren Studien (Kummer et al., 1992b) konnten auch in dieser Arbeit CGRP-immunreaktive Fasern im Alveolarparenchym dargestellt werden.

Die perivaskuläre Innervation durch CGRP-positive Fasern wurde an extra- und intrapulmonalen Venen und Arterien in ähnlicher Innervationsdichte dargestellt. Diese Ergebnisse werden durch frühere Studien untermauert (Kummer et al., 1992b; Martling et al., 1990). So konnten Kummer et al. eine Innervation der trachealen und extrapulmonalen Arterien nachweisen, deren Fasern neben CGRP auch SP enthielten. Lungenarterien waren sowohl intra- als auch extrapulmonal gleich stark durch CGRP-immunreaktive Fasern innerviert, und auch die Lungenvenen wiesen sowohl intra- als auch extrapulmonal CGRP-positive Fasern auf, wobei eine dichtere Innervation der extrapulmonalen Lungenvenen beobachtet werden konnte (Kummer et al., 1992b).

Intraganglionär wurden CGRP-immunreaktive Nervenfasern, jedoch keine immunreaktiven Zellkörper dargestellt. In vorangegangenen Studien wurden dichte nervale Netzwerke aus SP- und CGRP-positiven Fasern innerhalb der Ganglien beschrieben, die aus extrinsischen Nervenzellkörpern stammen (Kusindarta et al., 2004; Springall et al., 1987). CGRP-positive sensorische vagale Neurone, die für die tracheale und pulmonale Innervation verantwortlich sind, haben ihren Ursprung im Ganglion jugulare (Springall et al., 1987). Auch Vermutungen, dass Fasern, die gleichzeitig für SP und CGRP immunreaktiv sind, aus lokalen Atemwegsganglien stammen, wurden in früheren Untersuchungen geäußert (Dey et al., 1999). Im Ganglion stellatum und in lokalen Atemwegsganglien zeigten sich SP- und CGRP-positive Nervenfasern, nicht jedoch immunreaktive Zellkörper (Martling, 1987). Beim Meerschweinchen wurden Nervenzellkörper mit einer Immunreaktivität für CGRP im Ganglion stellatum, sowie in sympathischen Ganglien des thorakalen Grenzstrangs beobachtet (Kummer et al., 1992b).

Ein gemeinsames Vorkommen von VACHT und CGRP konnte in keinen der untersuchten Gewebeschichten nachgewiesen werden, so dass anhand dieser Ergebnisse die Vermutung nahe liegt, dass der Ursprung CGRP-immunreaktiver Fasern in eigenständigen nicht-cholinergen Neuronen zu finden ist.

4.2.7 SP-immunreaktive Nervenfasern

Im gesamten Respirationstrakt der Maus konnte in der Lamina propria und der glatten Muskulatur von Trachea bis hin zu Bronchioli terminales eine Versorgung mit SP-positiven Fasern dargestellt werden. Das entspricht den Ergebnissen früherer Studien, wobei in vielen SP-positiven Fasern zusätzlich CGRP nachgewiesen wurde (Kummer et al., 1992b; Kusindarta et al., 2004). Die Feststellung, dass die Lamina propria eine höhere Innervationsdichte als die glatte Atemwegsmuskulatur aufweist (Kusindarta et al., 2004), konnte in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Auch im respiratorischen Epithel und in der Alveolarregion wurde entgegen früheren Ergebnissen keine Immunreaktivität für SP beobachtet (Kummer et al., 1992; Kusindarta et al., 2004). Als Ursprung der die Atemwege innervierenden SP-positiven Nervenfasern konnten sensorische Neurone der Spinalganglien (Dalsgaard et al., 1984) und des Ganglion nodosum (Terenghi et al., 1986) identifiziert werden. Auch die Freisetzung von SP aus lokalen Atemwegsganglien wurde in vorangegangenen Studien an der Katze diskutiert (Dey et al., 1999), konnte jedoch an Untersuchungen am Meerschweinchen nicht bestätigt werden (Kummer et al., 1992b). Kusindarta et al. zeigten, dass sich innerhalb der Ganglien Netzwerke aus SP- und CGRP-positiven Fasern bildeten, die sich zu intraganglionären Netzwerken um einzelne Nervenzellkörper formierten (Kusindarta et al., 2004).

Die Pulmonalarterien waren nur extrapulmonal, nicht jedoch intrapulmonal vereinzelt von SP-positiven Fasern durchzogen, während sich in extrapulmonalen Venen eine höhere Innervationsdichte nachweisen ließ, die nach intrapulmonal abnehmend war. Entgegengesetzt zu diesen Ergebnissen zeigten frühere Studien am Meerschweinchen eine Innervation der großen Lungenarterien durch SP-positive Fasern, die bis in die kleinsten Gefäße dokumentiert werden konnten (Haberberger et al., 1997). Vereinbar mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit wurden SP-immunreaktive Fasern an allen großen Lungenvenen nachgewiesen (Haberberger et al., 1997; Kummer et al., 1992; Kusindarta et al., 2004; Martling et al., 1990; Springall et al., 1987).

Intraganglionär wurden keine SP-positiven Zellkörper beobachtet, es konnten aber immunreaktive Nervenfasern nachgewiesen werden, was vorangegangenen Untersuchungen an der Ratte und am Meerschweinchen entspricht (Kummer et al., 1992b; Kusindarta et al., 2004; Martling et al., 1990; Springall et al., 1987).

Entgegengesetzt zu diesen Beobachtungen zeigten Dey et al. beim Frettchen und der Katze SP-immunreaktive Zellkörper in lokalen Ganglien (Dey et al., 1991, 1999).

Zusammenfassend wurde in keinen der untersuchten Gewebeschichten ein gemeinsames Vorkommen von VACHT und SP nachgewiesen, was ein Vorhandensein eines eigenständigen Systems neben dem klassischen cholinergen System vermuten lässt.

4.2.8 NADPH-positive Fasern

In der gesamten glatten Atemwegsmuskulatur von Trachea und Bronchien waren NADPH-positive Fasern, bevorzugt in den extrapulmonalen Anteilen, zu finden. Eine positive Darstellung der NADPH-positiven Fasern in kleineren Bronchioli gelang jedoch nicht. Die Lamina propria der Trachea und der großen Bronchi war von NADPH-positiven Fasern durchzogen, wies jedoch eine geringere Innervationsdichte verglichen mit der Atemwegsmuskulatur auf. Auch im respiratorischen Tracheal- und Bronchialepithel wurde eine positive NADPH-Diaphorase-Reaktion beobachtet. Diese Ergebnisse entsprechen denen früherer Studien (Dey et al., 1993; Fischer und Hoffmann, 1996; Fischer et al., 1993). Es zeigten sich dabei NADPH-positive Fasern in der intra- und extrapulmonalen Atemwegsmuskulatur, wobei die extrapulmonalen Anteile eine größere Innervationsdichte enthielten. Bronchioli waren nicht durch NOS-positive Fasern innerviert. Zusätzlich wurde beobachtet, dass NADPH-positive Fasern gleichzeitig eine Immunreaktivität für NPY oder VIP aufwiesen, aber kein ChAT enthielten (Fischer und Hoffmann, 1996; Fischer et al., 1993). Entsprechend unseren Ergebnissen zeigten auch Studien am Menschen nur eine spärliche Innervation der Lamina propria (Fischer and Hoffmann, 1996). Wie auch in der vorliegenden Arbeit, wurde in vorangegangenen Untersuchungen am Meerschweinchen und am Frettchen eine positive NADPH-Diaphorase-Reaktion im respiratorischen Epithel der Trachea und großen Bronchi nachgewiesen (Dey et al., 1993; Fischer et al., 1993b).

Entlang pulmonaler Arterien konnten in der vorliegenden Arbeit mit von extra- nach intrapulmonal abnehmender Dichte vereinzelt NADPH-positive Nervenfasern dargestellt werden, hauptsächlich wies dabei das Endothel eine positive NADPH-Diaphorase-Reaktion auf. Die Darstellung der NOS an Pulmonalvenen gelang nur in

den mit Kardiomyozyten umgebenen Abschnitten größerer Venen. Diese Ergebnisse lassen sich durch frühere Studien bestätigen. Dabei beobachteten Haberberger et al. am Meerschweinchen, dass Pulmonalarterien mit einem Durchmesser über 700 µm intensiv von NADPH-positiven Fasern innerviert wurden, die Innervationsdichte jedoch zur Peripherie hin abnahm, so dass intraazinäre Gefäße nur noch gelegentlich durch NADPH-positive Fasern innerviert wurden (Haberberger et al., 1997). Übereinstimmend mit den Ergebnissen vorliegender Arbeit wurden auch in Studien von Haberberger et al. NADPH-positive Axone an Lungenvenen nachgewiesen, die Herzmuskulatur in ihrer Wand enthielten. NADPH-positive Fasern wurden an Gefäßen mit einem Durchmesser kleiner als 350 µm nicht dokumentiert. Zusätzlich konnte in pulmonalen Gefäßen eine Kolokalisation von NOS mit VIP oder NPY beobachtet werden, eine Immunreaktivität für ChAT bestand jedoch nicht (Haberberger et al., 1997).

Innerhalb lokaler Atemwegsganglien konnte im Gegensatz zu vorangegangenen Studien in dieser Arbeit keine Immunreaktivität für NOS dargestellt werden. Fischer und Hoffmann konnten hingegen an der Menschenlunge zeigen, dass intrinsische und sensorische Ganglien immunreaktiv für NOS waren und ihre Anzahl dabei von Trachea bis in die kleinen Atemwege zunehmend war (Fischer und Hoffmann, 1996). Durch retrograde Tracingexperimente konnten neben dem Plexus myentericus des Ösophagus (Balentova et al., 2013) sympathische und sensible Ganglien als Ursprung NOS-positiver Neurone identifiziert werden. Dabei lagen die zugehörigen Zellkörper im Ganglion stellatum und Ganglion cervicale superius, die vagalen sensiblen Axone wurden im Ganglion nodosum und Ganglion jugulare nachgewiesen (Fischer et al., 1996). In Untersuchungen am Meerschweinchen zeigte sich, dass die Zellkörper lokaler cholinergischer Atemwegsganglien nicht immunreaktiv für NOS waren (Canning und Fischer, 1997). In Studien an der Maus analysierten Balentova et al. die Innervationsdichte, Verteilung, den Ursprung und Arten parasymphatischer Nerven in der glatten Atemwegsmuskulatur. Dabei konnten deutlich mehr cholinerge Neurone in der glatten Muskulatur der Trachea nachgewiesen werden als NOS-positive Neurone (Balentova et al., 2013), was auch durch die vorliegende Arbeit bestätigt werden kann. Eine Kolokalisation von NOS und ChAT bestand nicht. Aus den vorliegenden Ergebnissen geht hervor, dass NO aus einer eigenständigen Gruppe von Neuronen freigesetzt wird und zum NANC-System zugeordnet werden kann. Da für NOS eine bronchodilatorische Wirkung beschrieben ist, cholinerge Neurone hingegen

bronchokonstriktorisches wirken, ist die Kenntnis über Verteilung und Dichte dieser Substanzen in der Atemwegsmuskulatur wichtig für weitere pharmakologische und physiologische Untersuchungen zur Therapie der chronisch entzündlichen Atemwegserkrankungen wie COPD oder Asthma bronchiale.

4.3 Die Innervation des Herzens und der Koronargefäße

4.3.1 PGP 9.5- immunreaktive Fasern

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle kardialen Gewebeschichten mit einer annähernd gleichen Innervationsdichte PGP 9.5-immunreaktiver Fasern versorgt werden, wobei das Epikard eine etwas höhere Innervationsdichte im Vergleich zu den übrigen Gewebeschichten aufweist. Auch die Koronararterien werden durch PGP 9.5-positive Fasern ähnlich intensiv innerviert wie die Herzmuskulatur. Ein Teil PGP 9.5- positiver Fasern war gleichzeitig immunreaktiv für VACHT. In vorangegangenen Studien wurden unseren Ergebnissen entsprechend PGP 9.5-positive Nervenfasern in allen kardialen Gewebeschichten nachgewiesen. Auffallend war die höhere Innervationsdichte des Reizleitungssystems verglichen mit der Herzmuskulatur (Crick et al., 1999a). Die höchste Innervationsdichte des Myokards wurde in den Vorhöfen, vor allem im endokardialen Teil des rechten Vorhofs beobachtet, die Herzkammern wiesen eine geringere Innervationsdichte auf. Verglichen mit den Vorhöfen konnten in den Herzkammern mehr PGP 9.5-positive Nervenfasern im epikardialen als im endokardialen Anteil der Muskulatur nachgewiesen werden. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wiesen Gulbenkian et al. eine Innervation kardialer Gefäße durch PGP-9.5 positive Fasern nach (Gulbenkian et al., 1987). PGP 9.5-positive Fasern bildeten dabei einen Plexus um Venen und Arterien, der bis in die Mediagrenze nachverfolgt werden konnte.

Zusammenfassend ermöglicht der Nachweis PGP 9.5-immunreaktiver Fasern die Darstellung der Gesamtinnervation des Herzens, und in allen kardialen Schichten wurde eine Kolokalisation von PGP 9.5 und VACHT beobachtet.

4.3.2 VAcHT-immunreaktive Fasern

VAcHT-immunreaktive Fasern konnten vor allem im Myokard und vereinzelt im Epikard nachgewiesen werden, eine Innervation des Endokards ließ sich in den Untersuchungen dieser Arbeit nur punktuell darstellen. Eine Unterscheidung der Innervationsdichte zwischen Kammern und Vorhöfen wurde nicht getroffen. Entgegen den hier vorliegenden Ergebnissen zeigten frühere Studien an der Ratte, dass die Vorhöfe verglichen mit den Herzkammern intensiver durch cholinerge Fasern innerviert wurden, wobei die größere Innervationsdichte im Epikard zu finden war und das Endokard nur vereinzelt von VAcHT-positiven Fasern durchzogen wurde (Crick et al., 1999a; Petrecca und Shrier, 1998). Am Schweineherzen wurden im rechten Endokard mehr cholinerge Fasern nachgewiesen als im linken, wohingegen sich zwischen Myokard und Epikard kein Unterschied in der Innervationsdichte und Lokalisation feststellen ließ (Crick et al., 1999a). In vorangegangenen Studien bei der Ratte konnte eine spärliche Innervation der Koronarien durch VAcHT-positive Fasern dargestellt werden (Sequeira et al., 2005), was durch unsere Ergebnisse untermauert werden kann. Steele et al. gelang es, intrinsische Ganglien als Ursprungsneurone der an der kardialen Innervation beteiligten cholinergen Fasern zu identifizieren und in einigen dieser Nervenfasern neben ACh auch NOS, SP, NPY und VIP nachzuweisen (Steele et al., 1996). Eine Immunreaktion der Zellkörper für CGRP oder TH wurde nicht beobachtet (Steele et al., 1994). Im Gegensatz hierzu konnte in den untersuchten kardialen Abschnitten der hier vorliegenden Arbeit eine Kolokalisation von VAcHT nur mit PGP 9.5 nachgewiesen werden. Andere Arbeiten konnten belegen, dass in kardialen Ganglien auch Axone sensorischer sowie postganglionär sympathischer Neurone enthalten sind (Weihe and Reinecke, 1981; Wharton et al., 1981).

4.3.3 VIP-immunreaktive Fasern

Gemäß der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse wird das Herz der Maus eher spärlich durch VIP-immunreaktive Fasern versorgt. Eine VIP-Immunreaktion ließ sich im Myokard, nicht aber im Epi- oder Endokard nachweisen. Die Koronararterien zeigten VIP-immunreaktive Nervenfasern vor allem um größere Gefäße, waren aber im Vergleich zum Myokard weniger dicht innerviert. Eine Kolokalisation von VIP und

VACHT wurde im Herzen nicht beobachtet, was vermuten lässt, dass VIP aus eigenständigen, nicht-cholinergen Neuronen freigesetzt wird.

Vorangegangene Studien am Meerschweinchen konnten VIP-positive Fasern vor allem in den Vorhöfen sowie perivaskulär und in intrinsischen kardialen Ganglien nachweisen (Parsons et al., 2006). In einigen dieser Ganglien wurde ein gleichzeitiges Vorkommen von VIP und ChAT beobachtet. Andere Studien zeigten ein gemeinsames Vorkommen von NOS und NPY in VIP-positiven Neuronen und vermuteten den Ursprung in intrinsischen Ösophagusganglien oder im sympathischen Grenzstrang (Della et al., 1983). VIP-immunreaktive Fasern konnten in Untersuchungen am Menschen-, Ratten- und am Meerschweinchenherzen im kardialen Reizleitungssystem, nicht aber im AV-Knoten nachgewiesen werden (Crick et al., 1994, 1996; Petrecca und Shrier, 1998). Überwiegend zeigten sich VIP-positive Fasern in den Vorhöfen und dabei insbesondere im Myokard. Die endokardialen Fasern befanden sich im Nervenplexus des linken Vorhofes sowie an den Einmündungen der Vena cava inferior und superior. Eine Innervation der Herzkammern durch VIP-immunreaktive Fasern wurde nicht nachgewiesen (Parsons et al., 2006). Im Bereich der Koronarien konnten VIP-immunreaktive Fasern in der Adventitia größerer und mittelgroßer Gefäße herzbasisnah und um kleinere Gefäße des rechten Vorhofs dargestellt werden (Parsons et al., 2006).

4.3.4 NPY-immunreaktive Fasern

In der vorliegenden Untersuchung konnte ein Netzwerk NPY-immunreaktiver Fasern im Myokard und Epikard sowie in Koronararterien dargestellt werden. Dabei wies das Myokard die größte Innervationsdichte auf, wohingegen im Endokard keine Immunreaktion zu beobachten war. Die Innervationsdichte der Koronararterien entsprach in etwa der des Epikards. Eine Kolokalisation von VACHT und NPY wurde vereinzelt im Epikard und um Koronararterien nachgewiesen. Daraus lässt sich schliessen, dass NPY überwiegend aus nicht-cholinergen Nervenfasern ausgeschüttet wird.

In vorangegangenen Studien wurde die Innervation der Herzmuskulatur, der Koronarien, sowie des Reizleitungssystem und intrinsischer Ganglien durch NPY-immunreaktive Fasern bestätigt (Franco-Cereceda et al., 1985; Kennedy et al., 1998;

Uddman et al., 1985). Als Ursprung konnten das Ganglion cervicale superius, das Ganglion stellatum, sowie die thorakalen Grenzstrangganglien identifiziert werden (Franco-Cereceda et al., 1985). Am Schweineherzen wurden NPY-immunreaktive Fasern in Vorhöfen und Herzkammern nachgewiesen. Ihr Verteilungsmuster entsprach dabei dem TH-positiver Fasern (Crick et al., 1996). Sowohl TH- als auch NPY-positive Fasern innervierten das Myokard und Endokard der rechten Herzhälfte stärker als das der linken und wiesen in den Herzkammern eine höhere Innervationsdichte als in Vorhöfen auf. Das Epikard wurde vermehrt von NPY-positiven Fasern innerviert (Crick et al., 1999a). Im humanen Herzen wurde eine ähnliche Faserverteilung beobachtet, im Gegensatz zum Schweineherzen wurde hier jedoch eine höhere Innervationsdichte durch TH- und NPY-positive Fasern im epikardialen Plexus nachgewiesen (Marron et al., 1994; Wharton et al., 1990). Entsprechend unseren Untersuchungen zeigten auch frühere Studien an Maus- und Rattenherzen eine stärkere Innervation des Myokards als des Epi- oder Endokards (Gu et al., 1984). Hierbei wurde eine Innervation der Vorhöfe und Kammern, der atrialen und ventrikulären Septen, sowie der Papillarmuskeln durch NPY-positive Fasern nachgewiesen (Gu et al., 1984). Wie auch in unseren Untersuchungen dargestellt, bestätigten Gu et al. in ihren Studien eine Innervation der Koronarien durch NPY-immunreaktive Fasern, dabei konnte kein Unterschied in der Innervationsdichte zwischen größeren und kleineren Gefäßen festgestellt werden.

4.3.5 TH-immunreaktive Fasern

Es fand sich eine ähnliche Verteilung TH-immunreaktiver Fasern verglichen mit NPY. Im Myo- und Endokard, nicht aber im Epikard konnten TH-positive Fasern nachgewiesen werden. Das Myokard wurde dabei stärker innerviert. Die Innervationsdichte der Koronarien entsprach der des Endokards.

In früheren Studien am Schweineherzen wurde im rechten Herzen eine höhere Innervationsdichte durch TH-positive Fasern im Myo- und Endokard verglichen mit dem linken Herzen beobachtet. Die Vorhöfe waren dichter innerviert als die Kammern, und zwischen dem Myokard des rechten und linken Ventrikels bestand kein Unterschied in der Innervationsdichte (Crick et al., 1999a). Die Faserverteilung des Epikards ähnelte der des Endokards mit dem Unterschied, dass das ventrikuläre Epikard im Vergleich zum atrialen stärker innerviert wurde. Untersuchungen am Rattenherzen zeigten, dass

das Reizleitungssystem eine höhere Faserdichte TH-immunreaktiver Axone im Vergleich zum Ventrikel- und Vorhofmyokard enthielt, und es gelang, positive Nervenfasern im AV-Knoten darzustellen (Petrecca und Shrier, 1998). Am Schweineherzen bildeten TH-positive Fasern die häufigste Faserpopulation im Reizleitungssystem (Crick et al., 1999a). Steele et al. wiesen in Untersuchungen am Meerschweinchen nach, dass das Herz durch sympathische postganglionäre Fasern innerviert wurde, wobei intrinsische kardiale Ganglien nicht immunreaktiv für TH waren (Steele et al., 1996). Innerhalb dieser Ganglien waren jedoch Nervenfasern nachweisbar, die neben TH auch NPY und Dynorphin enthielten (Steele et al., 1994). Obwohl TH und NPY am Herzen eine ähnliche Faserverteilung zeigten, waren intraganglionäre TH-immunreaktive Zellkörper im Schweineherzen nicht immunreaktiv für NPY. Es entstand daraus die Vermutung, dass der Ursprung TH-immunreaktiver Nervenfasern in extrinsischen nicht-kardialen Ganglien liegt (Crick et al., 1999a). Entsprechend unseren Ergebnissen zeigten frühere Arbeiten eine Innervation der Koronarien in allen kardialen Abschnitten (Rudehill et al., 1986; Sequeira et al., 2005). Atriale Koronararterien der Ratte wiesen jedoch im Vergleich zu ventrikulären Gefäßen eine intensivere noradrenerge Innervation auf (Sequeira et al., 2005).

4.3.6 CGRP-immunreaktive Fasern

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Innervation durch CGRP-positive Nervenfasern in der gleichen Intensität sowohl im Myo- als auch im Epikard nachgewiesen. Das Endokard hingegen zeigte keine immunreaktiven Fasern. Die Koronararterien waren innerviert und wiesen eine ähnliche Innervationsdichte wie das Myo- und Endokard auf. Eine Kolokalisation von VAcHT und CGRP lag in keinem der untersuchten Abschnitte vor. Die Vermutung liegt daher nahe, dass CGRP unabhängig von ACh aus eigenständigen Neuronen freigesetzt wird.

Frühere Studien beschrieben CGRP-positive Fasern, nach TH- und NPY-positiven, als die drittgrößte Subpopulation immunreaktiver Fasern, die an der kardialen Innervation beteiligt sind (Crick et al., 1999a). Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen konnten vorangegangene Arbeiten am Schweineherzen immunreaktive Fasern im Endo-, Myo- und Epikard von Herzvorhöfen und Herzkammern nachweisen (Crick et al., 1999a). Die höchste Innervationsdichte wurde dabei im Endokard des linken Herzens

beobachtet, die geringste im Endokard des rechten Herzens. Das Myokard enthielt verglichen mit Epi- und Endokard weniger CGRP-immunreaktive Fasern. Auch am Menschen-, Ratten- und am Meerschweinchenherzen gelang der Nachweis immunreaktiver Fasern in Vorhöfen und Kammern (Franco-Cereceda et al., 1988). Die Faserverteilung in Epi-, Myo- und Endokard des Vorhofs war annähernd gleich, während das Epikard und Endokard des Ventrikels intensiver als das Myokard innerviert wurde. Insgesamt konnte eine höhere Innervationsdichte der Vorhöfe im Vergleich zu den Ventrikeln nachgewiesen werden. Hierbei ließen sich neben CGRP-positiven Fasern SP-positive Nervenfasern beobachten. Wharton et al. beobachteten eine unterschiedliche Verteilung und Innervationsdichte CGRP-immunreaktiver Fasern an verschiedenen Spezies, was sie auf unterschiedliche kardiale Aktivität zurückführten (Wharton et al., 1988).

Eine Innervation der Koronararterien wurde in unseren Untersuchungen, wie auch in früheren Studien (Franco-Cereceda et al., 1988), bestätigt. Dabei konnte eine geringere Innervationsdichte der kleineren Gefäße verglichen mit den größeren beobachtet werden (Crick et al., 1999a). Eine Innervation der Koronarien durch VAcT und CGRP-immunreaktive Nervenfasern konnte hingegen, anders als in Studien von Crick et al. (Crick et al., 1999a), in unseren Untersuchungen nicht nachgewiesen werden.

4.3.7 SP-immunreaktive Fasern

Es konnte eine spärliche Innervation des Mausherzens durch SP-immunreaktive Nervenfasern nachgewiesen werden. Lediglich das Myokard und die Koronararterien zeigten in vergleichbarer Innervationsdichte eine Innervation durch SP-positive Fasern. Am Endo- und Epikard konnte keine Immunreaktivität nachgewiesen werden. VAcT/SP $+/+$ Fasern kamen nicht vor. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass SP-positive Fasern nicht cholinergen Ursprungs sind.

Entgegengesetzt zu diesen Ergebnissen zeigten frühere Studien am Ratten-, Meerschweinchen- und Menschenherzen immunreaktive Fasern nicht nur im Myo-, sondern auch im Epi- und Endokard (Franco-Cereceda et al., 1988). Wharton et al. wiederum stellten in ihren Untersuchungen fest, dass das Myokard zwar spärlich innerviert, das Epikard jedoch frei von SP-immunreaktiven Fasern ist. Sowohl

Herzkammern als auch Herzvorhöfe werden beim Menschen von SP-positiven Fasern versorgt, dabei werden die Vorhöfe etwas stärker innerviert (Wharton et al., 1990). Auch im Reizleitungssystem des Meerschweinchenherzens sind SP-immunreaktive Fasern enthalten (Crick et al., 1999a). Im Sinus- und AV-Knoten konnten SP-positive Fasern nachgewiesen werden, von denen einige gleichzeitig immunreaktiv für CGRP waren. Der AV-Knoten enthielt dabei eine höhere Faserdichte als der Sinusknoten. Die größte Faserdichte wurde in lokalen kardialen Ganglien beobachtet. Dabei waren Nervenzellkörper innerhalb der Ganglien von SP-positiven Nervenfasern umgeben (Wharton et al., 1988). Als Ursprung immunreaktiver Fasern wurden die Spinalganglien und die vagalen sensorischen Ganglien identifiziert. Ein geringerer Teil entstammt intrinsischen kardialen Ganglien (Bafuk and Gabella, 1989).

Übereinstimmend mit früheren Ergebnissen konnte auch bei unseren Untersuchungen eine Innervation der Koronararterien durch SP nachgewiesen werden (Dehlin und Levick, 2014; Dzurik et al., 2007; Hongbao et al., 2009).

4.3.8 NADPH-Diaphorase positive Fasern

Eine Innervation durch NADPH-Diaphorase-positive Fasern konnte in unseren Untersuchungen am Maus Herzen nachgewiesen werden. Dabei war vor allem im Myo- und im Epikard eine erhöhte Faserdichte zu beobachten, das Endokard war im Vergleich weniger intensiv durch NADPH-Diaphorase-positive Fasern innerviert. Auch im Endothel kardialer Gefäße konnte NOS dokumentiert werden. Innerhalb lokaler kardialer Ganglien wurden NADPH-Diaphorase-positive Fasern nachgewiesen. Diese Ergebnisse stimmen mit denen vorangegangener Studien weitestgehend überein. Am Meerschweinchenherzen konnten NADPH-Diaphorase-positive Fasern im Myokard der Vorhöfe beobachtet werden. Einige dieser Fasern waren gleichzeitig immunreaktiv für VIP und ChAT und befanden sich überwiegend an der Hinterwand des rechten Vorhofs sowie im Myokard in der Nähe des Sinusknotens (Parsons et al., 2006). Ebenso wurden NADPH-Diaphorase-positive Fasern im Reizleitungssystem, an Koronargefäßen und in lokalen kardialen Ganglien beschrieben (Klimaschewski et al., 1992). Dabei befinden sich NADPH-Diaphorase-positive Zellkörper kardialer Ganglien vor allem entlang der Pulmonalvenen, intratrial und subepikardial. Ihre NADPH-Diaphorase-positiven Fasern

sind extrinsischen Ursprungs (Calupca et al., 2000) und sind in einigen Fällen gleichzeitig immunreaktiv für NPY und ChAT (Richardson et al., 2003). Die Innervation der Koronarien durch NOS-positive Fasern wurde wie auch in unseren Ergebnissen durch vorangegangene Arbeiten bestätigt (Klimaschewski et al., 1992; Parsons et al., 2006; Richardson et al., 2003; Sequeira et al., 2005). Vergleichende Studien an Ratte und Meerschweinchen zeigten, dass NOS-positive Fasern unabhängig von der Gefäßgröße vorkommen (Sosunov et al., 1995)

4.4 Schlussfolgerung

Der Schwerpunkt vorliegender Arbeit lag in der Analyse der cholinergen Innervation des Respirationstraktes. Da ACh in der Innervation des bronchopulmonalen Systems eine wichtige Stellung einnimmt, war diese Faserklasse von besonderem Interesse. So wurde durch Anwendung der AChE-Enzymhistochemie und eines fluoreszierenden Antikörpers gegen das glattmuskuläre α -Aktin die Verteilung cholinergischer Nervenfasern in Abhängigkeit vom Durchmesser der Bronchien untersucht. Dabei konnten wir feststellen, dass die höchste Innervationsdichte in Bronchien mit einem Durchmesser von unter 100 μm zu finden ist und die cholinergen Fasern bis in die kleinsten Bronchioli nachverfolgt werden können. Entgegen einer früher geäußerten Vermutung, dass die kleinsten Atemwege gar nicht innerviert seien, scheinen diese gerade besonders ausgeprägt unter cholinergischer neuronaler Kontrolle zu stehen. Diese Erkenntnis ist darüberhinaus auch deswegen interessant, weil ACh an inflammatorischen Umbauprozessen bei chronisch entzündlichen Lungenerkrankungen wie Asthma bronchiale oder COPD eine signifikante Rolle spielt (Gosens et al., 2004).

Ferner war der Nachweis von Kotransmittern zu ACh interessant, so dass in diesem Teil der Studie zusätzlich zum Respirationstrakt auch die Innervation des Herzens und des Ösophagus im Hinblick auf das Vorhandensein möglicher Kotransmitter zu ACh untersucht wurde. Hierfür erfolgte nach Darstellung einer Gesamtinnervation der Brustraumorgane durch Einsatz des neuronalen Proteins PGP 9.5 die Anwendung von Immunhistochemie und Fluoreszenzmarkierungen mit Antikörpern gegen VACHT, den Neuropeptiden NPY, VIP, CGRP und SP sowie dem Enzym TH. Hierbei wurden nicht nur ausschließlich VACHT-positive Nervenfasern dargestellt, sondern auch Fasern, die ausschließlich ein Neuropeptid (SP, NPY, CGRP, VIP) oder ein

Transmittersyntheseenzym (NOS, TH) enthielten. Auch Kolokalisationen wurden nachgewiesen und traten zwischen VAcHT und PGP 9.5 und VAcHT und NPY auf. Da PGP 9.5 als ein genereller neuronaler Marker nicht an der Transmittersynthese beteiligt ist, sind diese Kolokalisationen funktionell nicht relevant. VAcHT/NPY^{+/+} kam ausschliesslich in Nervenzellkörpern und vereinzelt in Nervenfasern im Epikard, um Koronararterien und um extrapulmonale Pulmonalvenen vor. Weitere Kolokalisationen konnten in dieser Studie an der Maus nicht dargestellt werden, so dass zusammenfassend mehr rein VAcHT-positive oder nur das entsprechende Neuropeptid oder die entsprechende Transmittersubstanz enthaltene Fasern an der Innervation der Brustraumorgane beteiligt sind, als zweifach positive Nervenfasern. Nach diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass neben den klassischen cholinergen Neuronen auch autonome NANC-Neurone vorhanden sind, die die Brustraumorgane innervieren.

5. Zusammenfassung

Als stärkster Bronchokonstriktor nimmt ACh in der Innervation des Respirationstraktes eine wichtige Stellung ein, eine cholinerge Innervation der kleinsten Atemwege wurde jedoch angezweifelt. In dieser Arbeit sollte daher die cholinerge Innervation sowie die Verteilung cholinergischer Fasern in unterschiedlichen Abschnitten des Respirationstraktes quantitativ erfasst und mögliche Kotransmitter identifiziert werden.

Mittels AChE-Enzymhistochemie und eines fluoreszierenden Antikörpers gegen das glattemuskuläre α -Aktin wurde die Innervationsdichte der Atemwegsmuskulatur in verschiedenen Abschnitten des bronchopulmonalen Systems der Maus dargestellt und quantitativ erfasst. Mögliche Kotransmitter zu ACh wurden mittels Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen VACHT, die Neuropeptide NPY, VIP, CGRP, und SP sowie dem Enzym TH identifiziert. Die NOS wurde mittels NADPH-Diaphorase-Reaktion dargestellt, die Gesamtnnervation der Brustraumorgane mit einem Antikörper gegen das panneuronale Protein PGP 9.5. Zusätzlich wurde auch die cholinerge Innervation des Ösophagus und des Herzens untersucht, wobei hier keine quantitative Analyse erfolgte. Wir konnten feststellen, dass die höchste Innervationsdichte in Bronchien mit einem Durchmesser von unter 100 μ m zu finden ist und die cholinergen Fasern bis in die kleinsten Bronchioli nachverfolgt werden können. Kolokalisationen wurden nur vereinzelt zwischen VACHT und NPY in intraganglionären Zellkörpern sowie in Nervenfasern im Epikard, um Koronararterien und um extrapulmonale Pulmonalvenen gefunden. Andere Kolokalisationen wurden, außer den mit dem panneuronalen Marker PGP 9.5, nicht dargestellt, wobei nicht-cholinerge katecholaminerge (TH-positiv), nitrerge (NADPH-Diaphorase-positiv) und peptiderge (CGRP, SP, VIP) nachweisbar waren. Alle Neurone intrinsischer Ganglien zeigten sich immunreaktiv für VACHT. Es lässt sich schlussfolgern, dass, entgegen einer früher geäußerten Vermutung, die kleinsten Atemwege gerade besonders ausgeprägt unter cholinergischer neuronaler Kontrolle zu stehen scheinen. Zudem innervieren neben den klassischen cholinergen Neuronen auch NANC-Neurone die Brustraumorgane. Da ACh bei inflammatorischen Umbauprozessen bei Lungenerkrankungen wie Asthma bronchiale oder COPD eine signifikante Rolle spielt, können diese Befunde zum besseren Verständnis pathophysiologischer Prozesse beitragen und somit die Möglichkeit zur Optimierung bestehender Therapieansätze bieten.

6. Summary

As a major bronchoconstrictor ACh plays an important role in the innervation of the respiratory system. Yet it has been questioned, whether smallest airways receive cholinergic innervation. Thus, the present study aimed to demonstrate and quantify the cholinergic innervation of different segments of the mouse lower respiratory tract and to identify potential cotransmitters. The innervation density of airway muscles in different segments of the bronchopulmonary system was studied by means of AChE histochemical staining and immunolabeling of α -smooth muscle actin. Cotransmitters were identified by double-labelling immunofluorescence with antibodies against VACHT, the neuropeptides NPY, VIP, CGRP and SP as well as the enzyme TH. NOS activity was visualized by means of NADPH-diaphorase reaction, the overall innervation with an antibody against the panneuronal protein PGP 9.5. The cholinergic innervation of the oesophagus and the heart was also analyzed, a quantitative analysis, however, was not performed. The highest innervation density was found in bronchi with a diameter of less than 100 μ m, and cholinergic fibers could be traced to the smallest bronchioles. Colocalizations were only sporadically revealed between VACHT and NPY in intrinsic neuronal cell bodies and axons in the epicardium, around coronary vessels and pulmonary veins close to the heart. Further colocalizations, except for the panneuronal protein PGP 9.5, were not observed, but separate populations of catecholaminergic (TH-positive), nitroergic (NADPH-diaphorase positive), and peptidergic (CGRP, SP, VIP) were noted. All neurons of intrinsic ganglia showed VACHT-immunoreactivity.

In conclusion, in contrast to previous assumptions, the smallest airways are under particularly prominent cholinergic control. In addition to cholinergic and catecholaminergic neurons, NANC neurons also innervate thoracic organs.

Since ACh plays an important role in the airway remodeling seen in pulmonary diseases such as bronchial asthma or COPD, the present findings contribute to a better understanding of pathophysiological process and may be helpful to improve current therapeutic approaches.

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
BChE	Butyrylcholinesterase
BP	Bandpass
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
Cy3	Carbocyanin 3
ChAT	Cholinacetyltransferase
CHT	Cholintransporter
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
IgG	Immunglobulin G
mg	Milligramm
ml	Milliliter
NA	Noradrenalin
NaCl	NaCl
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NANC	Nicht-adrenerges, nicht-cholinerges System
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NPY	Neuropeptid Tyrosin
OCT	organische Kationentransporter
PBS	Phosphate-buffered saline
PGP 9.5	Protein gene product 9.5
S.	Seite
SP	Substanz P
Tab.	Tabelle
TH	Tyrosinhydroxylase
VIP	Vasoactives intestinales peptid
ZTL	Zentrales Tierlabor

9. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Verwendete Geräte und Materialien	S. 17
Tab. 2:	Verwendeter Primärantikörper im Rahmen der AChE-Immunhistochemie	S. 18
Tab. 3:	Charakteristiken der Filter für die Fluoreszenzmikroskopie	S. 21
Tab. 4:	Verwendete Sekundärantikörper	S. 21
Tab. 5:	Verwendete Primärantikörper im Rahmen der Doppelimmunhistochemie	S. 22
Tab. 6:	Innervationsdichte von VACHT und PGP 9.5	S. 29
Tab. 7:	Innervationsdichte von VACHT und VIP	S. 39
Tab. 8:	Innervationsdichte von VACHT und NPY	S. 45
Tab. 9:	Innervationsdichte von VACHT und TH	S. 52
Tab. 10:	Innervationsdichte von VACHT und CGRP	S. 57
Tab. 11:	Innervationsdichte von VACHT und SP	S. 66

10. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Quantitative Analyse der AChE-Histochemie.	S. 26
Abb. 2:	Trachea, PGP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 30
Abb. 3:	Bronchus, PGP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 30
Abb. 4:	Bronchus, PGP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 31
Abb. 5:	Bronchiolus, PGP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 31
Abb. 6:	Pleura, PGP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 32
Abb. 7:	Alveolarregion, PGP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 32
Abb. 8:	Pulmonalarterie extrapulmonal, PGP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 32
Abb. 9:	Pulmonalarterie intrapulmonal, PGP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 33
Abb. 10:	Pulmonalvene extrapulmonal, PGP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 33
Abb. 11:	Pulmonalvene intrapulmonal, PGP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 33
Abb. 12:	Epikard, PGP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 34
Abb. 13:	Endokard, PGP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 34
Abb. 14:	Myokard, PGP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 34
Abb. 15:	Koronararterie, PGP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 35
Abb. 16:	Ösophagus, PGP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 35
Abb. 17:	Ganglion, PGP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 36
Abb. 18:	Bronchus, VIP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 40
Abb. 19:	Bronchus, VIP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 40
Abb. 20:	Bronchiolus, VIP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 41
Abb. 21:	Pulmonalvene, VIP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 41

Abb. 22:	Ösophagus, VIP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 41
Abb. 23:	Ösophagus, VIP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 42
Abb. 24:	Ganglion, VIP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 42
Abb. 25:	Trachea, NPY/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 46
Abb. 26:	Bronchus, NPY/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 46
Abb. 27:	Bronchiolus und Pulmonalvene, NPY/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 47
Abb. 28:	Pulmonalvene extrapulmonal, NPY/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 47
Abb. 29:	Koronararterie, NPY/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 47
Abb. 30:	Koronararterie, NPY/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 48
Abb. 31:	Epikard, NPY/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 48
Abb. 32:	Myokard, NPY/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 48
Abb. 33:	Ösophagus, NPY/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 49
Abb. 34:	Ösophagus, NPY/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 49
Abb. 35:	Ganglion, NPY/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 49
Abb. 36:	Trachea, TH/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 53
Abb. 37:	Bronchus, TH/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 53
Abb. 38:	Arterie extrapulmonal, TH/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 54
Abb. 39:	Pulmonalvene extrapulmonal, TH/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 54
Abb. 40:	Ösophagus, Tunica muscularis, TH/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 54
Abb. 41:	Ganglion, TH/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 55
Abb. 42:	Trachea, CGRP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 58
Abb. 43:	Trachea, CGRP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 58
Abb. 44:	Bronchus, CGRP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 59
Abb. 45:	Bronchus, CGRP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 59
Abb. 46:	Alveolaregion, CGRP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 60
Abb. 47:	Pulmonalvene, CGRP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 60
Abb. 48:	Pulmonalvene, CGRP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 61
Abb. 49:	Pulmonalarterie, CGRP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 61
Abb. 50:	Koronararterie, CGRP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 62
Abb. 51:	Myokard, CGRP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 62
Abb. 52:	Endokard, CGRP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 62
Abb. 53:	Epikard, CGRP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 63
Abb. 54:	Ösophagus, CGRP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 63
Abb. 55:	Ganglion, CGRP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 63
Abb. 56:	Trachea, SP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 67
Abb. 57:	Bronchus, SP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 67
Abb. 58:	Pulmonalvene extrapulmonal, SP/VACHT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 67

Abb. 59:	Koronararterie, SP/VChT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 68
Abb. 60:	Koronararterie, SP/VChT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 68
Abb. 61:	Myokard, SP/VChT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 69
Abb. 62:	Ösophagus, SP/VChT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 69
Abb. 63:	Ganglion, SP/VChT-Doppelimmunfluoreszenz	S. 69
Abb. 64:	Ösophagus, NADPH-Diaphorase-Reaktion	S. 71
Abb. 65:	Ösophagus, NADPH-Diaphorase-Reaktion	S. 71
Abb. 66:	Ösophagus, NADPH-Diaphorase-Reaktion	S. 72
Abb. 67:	Ösophagus, NADPH-Diaphorase-Reaktion	S. 72
Abb. 68:	Myokard, NADPH-Diaphorase-Reaktion	S. 72
Abb. 69:	Myokard, NADPH-Diaphorase-Reaktion	S. 73
Abb. 70:	Epikard, NADPH-Diaphorase-Reaktion	S. 73
Abb. 71:	Epi-, Myo- und Endokard, NADPH-Diaphorase-Reaktion	S. 73
Abb. 72:	Kardiales Ganglion mit Ganglienzellkörper, NADPH-Diaphorase-Reaktion	S. 74
Abb. 73:	Koronararterie, NADPH-Diaphorase-Reaktion	S. 74
Abb. 74:	Pulmonalvene, NADPH-Diaphorase-Reaktion	S. 74
Abb. 75:	Bronchiolus, NADPH-Diaphorase-Reaktion	S. 75
Abb. 76:	Bronchus, NADPH-Diaphorase-Reaktion	S. 75
Abb. 77:	Trachea, NADPH-Diaphorase-Reaktion	S. 75

11. Literaturverzeichnis

Accili, E.A., Buchan, A.M., Kwok, Y.N., Ledsome, J.R., and Brown, J.C. (1995). Presence and actions of vasoactive intestinal peptide in the isolated rabbit heart. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73, 134–139.

Adriaensen, D., and Scheuermann, D.W. (1993). Neuroendocrine cells and nerves of the lung. *Anat. Rec.* 236, 70–85; discussion 85–86.

Adriaensen, D., Brouns, I., Pintelon, I., De Proost, I., and Timmermans, J.-P. (2006). Evidence for a role of neuroepithelial bodies as complex airway sensors: comparison with smooth muscle-associated airway receptors. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 101, 960–970.

Allen, C.J., Ghilardi, J.R., Vigna, S.R., Mannon, P.J., Taylor, I.L., McVey, D.C., Maggio, J.E., and Mantyh, P.W. (1993). Neuropeptide Y/peptide YY receptor binding sites in the heart: localization and pharmacological characterization. *Neuroscience* 53, 889–898.

Allen, J.M., Polak, J.M., Rodrigo, J., Darcy, K., and Bloom, S.R. (1985a). Localisation of neuropeptide Y in nerves of the rat cardiovascular system and the effect of 6-hydroxydopamine. *Cardiovasc. Res.* 19, 570–577.

Allen, J.M., Polak, J.M., and Bloom, S.R. (1985b). Presence of the predicted C-flanking peptide of neuropeptide Y (CPON) in tissue extracts. *Neuropeptides* 6, 95–100.

Allen, Y.S., Bloom, S.R., and Polak, J.M. (1986). The neuropeptide Y-immunoreactive neuronal system: discovery, anatomy and involvement in neurodegenerative disease. *Hum. Neurobiol.* 5, 227–234.

Amara, S.G., Arriza, J.L., Leff, S.E., Swanson, L.W., Evans, R.M., and Rosenfeld, M.G. (1985). Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide. *Science* 229, 1094–1097.

Andersson, R.G., and Grundström, N. (1987). Innervation of airway smooth muscle. Efferent mechanisms. *Pharmacol. Ther.* 32, 107–130.

Anlauf, M., Schäfer, M.K.-H., Eiden, L., and Weihe, E. (2003). Chemical coding of the human gastrointestinal nervous system: cholinergic, VIPergic, and catecholaminergic phenotypes. *J. Comp. Neurol.* 459, 90–111.

Armour, J.A., and Hopkins, D.A. (1981). Localization of sympathetic postganglionic neurons of physiologically identified cardiac nerves in the dog. *J. Comp. Neurol.* 202, 169–184.

Arnal, J.F., Dinh-Xuan, A.T., Pueyo, M., Darblade, B., and Rami, J. (1999). Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 55, 1078–1087.

Arvidsson, U., Riedl, M., Elde, R., and Meister, B. (1997). Vesicular acetylcholine transporter (VACHT) protein: a novel and unique marker for cholinergic neurons in the central and peripheral nervous systems. *J. Comp. Neurol.* 378, 454–467.

- Balentova, S., Conwell, S., and Myers, A.C. (2013). Neurotransmitters in parasympathetic ganglionic neurons and nerves in mouse lower airway smooth muscle. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 189, 195–202.
- Baljet, B., and Drukker, J. (1975). An acetylcholinesterase method for in toto staining of peripheral nerves. *Stain Technol.* 50, 31–36.
- Bańuk, P., and Gabella, G. (1989). Some intrinsic neurons of the guinea-pig heart contain substance P. *Neurosci. Lett.* 104, 269–273.
- Baraniuk, J.N., Lundgren, J.D., Okayama, M., Mullol, J., Merida, M., Shelhamer, J.H., and Kaliner, M.A. (1990). Vasoactive intestinal peptide in human nasal mucosa. *J. Clin. Invest.* 86, 825–831.
- Barnes, P.J. (1986a). Adrenergic and non-adrenergic, non-cholinergic control of airways. *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* 50 Suppl 2, 9–16.
- Barnes, P.J. (1986b). Airway inflammation and autonomic control. *Eur. J. Respir. Dis. Suppl.* 147, 80–87.
- Barnes, P.J. (1986c). Non-adrenergic non-cholinergic neural control of human airways. *Arch. Int. Pharmacodyn. Thérapie* 280, 208–228.
- Barnes, P.J. (1987). Neuropeptides in human airways: function and clinical implications. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136, S77–S83.
- Barnes, P.J. (1988). Neuropeptides and airway smooth muscle. *Pharmacol. Ther.* 36, 119–129.
- Barnes, P.J. (1992). Neural mechanisms in asthma. *Br. Med. Bull.* 48, 149–168.
- Barnes, P.J. (2004). Distribution of receptor targets in the lung. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 1, 345–351.
- Barnes, P.J., Baraniuk, J.N., and Belvisi, M.G. (1991a). Neuropeptides in the respiratory tract. Part II. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144, 1391–1399.
- Barnes, P.J., Baraniuk, J.N., and Belvisi, M.G. (1991b). Neuropeptides in the respiratory tract. Part I. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144, 1187–1198.
- Barouch, L.A., Harrison, R.W., Skaf, M.W., Rosas, G.O., Cappola, T.P., Kobeissi, Z.A., Hobai, I.A., Lemmon, C.A., Burnett, A.L., O'Rourke, B., et al. (2002). Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature* 416, 337–339.
- Baur, R. (1969). [On estimation of the smallest permissible random sample size for stereologic measurements on histologic sections]. *Experientia* 25, 554–555.
- Behrends, J., Bischofberger, J., and Deutzmann, R. (2012). *Duale Reihe Physiologie* (Georg Thieme Verlag).

- Bell, D., and McDermott, B.J. (1994). Calcitonin gene-related peptide stimulates a positive contractile response in rat ventricular cardiomyocytes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 23, 1011–1021.
- Belvisi, M.G., Stretton, D., and Barnes, P.J. (1991). Nitric oxide as an endogenous modulator of cholinergic neurotransmission in guinea-pig airways. *Eur. J. Pharmacol.* 198, 219–221.
- Belvisi, M.G., Miura, M., Stretton, D., and Barnes, P.J. (1993). Endogenous vasoactive intestinal peptide and nitric oxide modulate cholinergic neurotransmission in guinea-pig trachea. *Eur. J. Pharmacol.* 231, 97–102.
- Berger, null (2000). PAR2 antagonists-the next generation of anti- inflammatories? *BMJ* 320, 334.
- Billiar, T.R. (1995). Nitric oxide. Novel biology with clinical relevance. *Ann. Surg.* 221, 339–349.
- Bleecker, E.R. (1986). Cholinergic and neurogenic mechanisms in obstructive airways disease. *Am. J. Med.* 81, 93–102.
- Booth, B.P., Tabrizi-Fard, M.A., and Fung, H. (2000). Calcitonin gene-related peptide-dependent vascular relaxation of rat aorta. An additional mechanism for nitroglycerin. *Biochem. Pharmacol.* 59, 1603–1609.
- Born, W., Fischer, J.A., and Muff, R. (2002). Receptors for calcitonin gene-related peptide, adrenomedullin, and amylin: the contributions of novel receptor-activity-modifying proteins. *Receptors Channels* 8, 201–209.
- Bowden, J.J., and Gibbins, I.L. (1992). Vasoactive intestinal peptide and neuropeptide Y coexist in non-noradrenergic sympathetic neurons to guinea pig trachea. *J. Auton. Nerv. Syst.* 38, 1–19.
- Brady, A.J., Warren, J.B., Poole-Wilson, P.A., Williams, T.J., and Harding, S.E. (1993). Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. *Am. J. Physiol.* 265, H176–H182.
- Bredt, D.S., and Snyder, S.H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 682–685.
- Bredt, D.S., Hwang, P.M., and Snyder, S.H. (1990). Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347, 768–770.
- Brouns, I., Oztay, F., Pintelon, I., De Proost, I., Lembrechts, R., Timmermans, J.-P., and Adriaensen, D. (2009). Neurochemical pattern of the complex innervation of neuroepithelial bodies in mouse lungs. *Histochem. Cell Biol.* 131, 55–74.
- Burnstock, G., and Kennedy, C. (1986). A dual function for adenosine 5'-triphosphate in the regulation of vascular tone. Excitatory cotransmitter with noradrenaline from perivascular nerves and locally released inhibitory intravascular agent. *Circ. Res.* 58, 319–330.

- Calupca, M.A., Vizzard, M.A., and Parsons, R.L. (2000). Origin of neuronal nitric oxide synthase (NOS)-immunoreactive fibers in guinea pig parasympathetic cardiac ganglia. *J. Comp. Neurol.* 426, 493–504.
- Campbell, L.K., Thomas, J.R., Lamps, L.W., Smoller, B.R., and Folpe, A.L. (2003). Protein gene product 9.5 (PGP 9.5) is not a specific marker of neural and nerve sheath tumors: an immunohistochemical study of 95 mesenchymal neoplasms. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 16, 963–969.
- Canning, B.J. (2006). Anatomy and neurophysiology of the cough reflex: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 129, 33S – 47S.
- Canning, B.J., and Fischer, A. (1997a). Localization of cholinergic nerves in lower airways of guinea pigs using antisera to choline acetyltransferase. *Am. J. Physiol.* 272, L731–L738.
- Canning, B.J., and Fischer, A. (1997b). Localization of cholinergic nerves in lower airways of guinea pigs using antisera to choline acetyltransferase. *Am. J. Physiol.* 272, L731–L738.
- Canning, B.J., and Fischer, A. (2001). Neural regulation of airway smooth muscle tone. *Respir. Physiol.* 125, 113–127.
- Canning, B.J., and Undem, B.J. (1993a). Evidence that distinct neural pathways mediate parasympathetic contractions and relaxations of guinea-pig trachealis. *J. Physiol.* 471, 25–40.
- Canning, B.J., and Undem, B.J. (1993b). Relaxant innervation of the guinea-pig trachealis: demonstration of capsaicin-sensitive and -insensitive vagal pathways. *J. Physiol.* 460, 719–739.
- Canning, B.J., Fischer, A., and Undem, B.J. (1998a). Pharmacological analysis of the tachykinin receptors that mediate activation of nonadrenergic, noncholinergic relaxant nerves that innervate guinea pig trachealis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284, 370–377.
- Canning, B.J., Fischer, A., and Undem, B.J. (1998b). Pharmacological analysis of the tachykinin receptors that mediate activation of nonadrenergic, noncholinergic relaxant nerves that innervate guinea pig trachealis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284, 370–377.
- Cannon, R.O. (1998a). Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin. Chem.* 44, 1809–1819.
- Cannon, R.O. (1998b). Potential mechanisms for the effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on endothelial dysfunction: the role of nitric oxide. *Am. J. Cardiol.* 82, 8S – 10S.
- Carswell, H., and Nahorski, S.R. (1983). Beta-adrenoceptor heterogeneity in guinea-pig airways: comparison of functional and receptor labelling studies. *Br. J. Pharmacol.* 79, 965–971.
- Caulfield, M.P., and Birdsall, N.J. (1998). International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol. Rev.* 50, 279–290.

- Caulfield, M.P., Straughan, D.W., Cross, A.J., Crow, T., and Birdsall, N.J. (1982). Cortical muscarinic receptor subtypes and Alzheimer's disease. *Lancet* 2, 1277.
- Ceccatelli, S., Lundberg, J.M., Zhang, X., Aman, K., and Hökfelt, T. (1994). Immunohistochemical demonstration of nitric oxide synthase in the peripheral autonomic nervous system. *Brain Res.* 656, 381–395.
- Chang, M.M., Leeman, S.E., and Niall, H.D. (1971). Amino-acid sequence of substance P. *Nature. New Biol.* 232, 86–87.
- Chang, Y., Hoover, D.B., Hancock, J.C., and Smith, F.M. (2000). Tachykinin receptor subtypes in the isolated guinea pig heart and their role in mediating responses to neurokinin A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294, 147–154.
- Coleridge, J.C., and Coleridge, H.M. (1984). Afferent vagal C fibre innervation of the lungs and airways and its functional significance. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 99, 1–110.
- Corcoran, B.M. (1996). Distribution of calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal polypeptide, neuropeptide Y, substance P and dopamine beta-hydroxylase immunoreactive nerve fibres in the trachea of sheep. *Res. Vet. Sci.* 60, 69–75.
- Corcoran, B.M., Jarvis, S., Hahn, C.N., and Mayhew, I.G. (1999). The distribution of nerve fibres immunoreactive for vasoactive intestinal peptide, calcitonin gene-related peptide, substance P and dopamine beta-hydroxylase in the normal equine larynx. *Res. Vet. Sci.* 67, 251–259.
- Coulson, F.R., and Fryer, A.D. (2003). Muscarinic acetylcholine receptors and airway diseases. *Pharmacol. Ther.* 98, 59–69.
- Crick, S.J., Sheppard, M.N., Anderson, R.H., Polak, J.M., and Wharton, J. (1996). A quantitative study of nerve distribution in the conduction system of the guinea pig heart. *J. Anat.* 188 (Pt 2), 403–416.
- Crick, S.J., Anderson, R.H., Ho, S.Y., and Sheppard, M.N. (1999a). Localisation and quantitation of autonomic innervation in the porcine heart II: endocardium, myocardium and epicardium. *J. Anat.* 195 (Pt 3), 359–373.
- Crick, S.J., Sheppard, M.N., Ho, S.Y., and Anderson, R.H. (1999b). Localisation and quantitation of autonomic innervation in the porcine heart I: conduction system. *J. Anat.* 195 (Pt 3), 341–357.
- Crimi, N., and Mistretta, A. (1989). Non-adrenergic non-cholinergic nervous control of airways. *Eur. Respir. J. Suppl.* 6, 508s – 511s.
- Cuello, A.C. (1983). Nonclassical neuronal communications. *Fed. Proc.* 42, 2912–2922.
- Cuello, A.C., Priestley, J.V., and Matthews, M.R. (1982). Localization of substance P in neuronal pathways. *Ciba Found. Symp.* 55–83.
- Dalsgaard, C.J., and Lundberg, J.M. (1984). Evidence for a spinal afferent innervation of the guinea pig lower respiratory tract as studied by the horseradish peroxidase technique. *Neurosci. Lett.* 45, 117–122.

Dalsgaard, C.J., Franco-Cereceda, A., Saria, A., Lundberg, J.M., Theodorsson-Norheim, E., and Hökfelt, T. (1986). Distribution and origin of substance P- and neuropeptide Y-immunoreactive nerves in the guinea-pig heart. *Cell Tissue Res.* 243, 477–485.

Darvesh, S., Hopkins, D.A., and Geula, C. (2003). Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 131–138.

Davies, P.J., and Donald, J.A. (1992). The distribution and colocalization of neuropeptides in perivascular nerves innervating the large arteries and veins of the snake, *Elaphe obsoleta*. *Cell Tissue Res.* 269, 495–504.

Day, I.N., and Thompson, R.J. (1987). Molecular cloning of cDNA coding for human PGP 9.5 protein. A novel cytoplasmic marker for neurones and neuroendocrine cells. *FEBS Lett.* 210, 157–160.

Dehlin, H.M., and Levick, S.P. (2014). Substance P in heart failure: the good and the bad. *Int. J. Cardiol.* 170, 270–277.

Della, N.G., Papka, R.E., Furness, J.B., and Costa, M. (1983). Vasoactive intestinal peptide-like immunoreactivity in nerves associated with the cardiovascular system of guinea-pigs. *Neuroscience* 9, 605–619.

Delpierre, S., Fornaris, E., Fornaris, M., and Grimaud, C. (1980). Pulmonary mechanics during hypoxia in spontaneously breathing anesthetized rabbits. *J. Auton. Nerv. Syst.* 2, 391–401.

Dennis, T., Fournier, A., St Pierre, S., and Quirion, R. (1989). Structure-activity profile of calcitonin gene-related peptide in peripheral and brain tissues. Evidence for receptor multiplicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 251, 718–725.

Deuschl, G., and Illert, M. (1981). Cytoarchitectonic organization of lumbar preganglionic sympathetic neurons in the cat. *J. Auton. Nerv. Syst.* 3, 193–213.

Deuschl, G., Illert, M., Aschoff, A., and Holländer, H. (1981). Single preganglionic sympathetic neurons of the cat branch intraspinally and project through different rami communicantes albi--a retrograde double labelling study with fluorescent tracers. *Neurosci. Lett.* 21, 1–5.

Dey, R.D., Shannon, W.A., and Said, S.I. (1981). Localization of VIP-immunoreactive nerves in airways and pulmonary vessels of dogs, cat, and human subjects. *Cell Tissue Res.* 220, 231–238.

Dey, R.D., Altemus, J.B., and Michalkiewicz, M. (1991). Distribution of vasoactive intestinal peptide- and substance P-containing nerves originating from neurons of airway ganglia in cat bronchi. *J. Comp. Neurol.* 304, 330–340.

Dey, R.D., Mayer, B., and Said, S.I. (1993). Colocalization of vasoactive intestinal peptide and nitric oxide synthase in neurons of the ferret trachea. *Neuroscience* 54, 839–843.

Dey, R.D., Altemus, J.B., Rodd, A., Mayer, B., Said, S.I., and Coburn, R.F. (1996). Neurochemical characterization of intrinsic neurons in ferret tracheal plexus. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 14, 207–216.

Dey, R.D., Satterfield, B., and Altemus, J.B. (1999). Innervation of tracheal epithelium and smooth muscle by neurons in airway ganglia. *Anat. Rec.* 254, 166–172.

Dinh, Q.T., Groneberg, D.A., Peiser, C., Mingomataj, E., Joachim, R.A., Witt, C., Arck, P.C., Klapp, B.F., and Fischer, A. (2004a). Substance P expression in TRPV1 and trkA-positive dorsal root ganglion neurons innervating the mouse lung. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 144, 15–24.

Dinh, Q.T., Groneberg, D.A., Peiser, C., Springer, J., Joachim, R.A., Arck, P.C., Klapp, B.F., and Fischer, A. (2004b). Nerve growth factor-induced substance P in capsaicin-insensitive vagal neurons innervating the lower mouse airway. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 34, 1474–1479.

Dinh, Q.T., Groneberg, D.A., Witt, C., Peiser, C., Cifuentes, L.B., Frossard, N., Klapp, B.F., and Fischer, A. (2004c). Expression of tyrosine hydroxylase and neuropeptide tyrosine in mouse sympathetic airway-specific neurons under normal situation and allergic airway inflammation. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 34, 1934–1941.

Dinh, Q.T., Groneberg, D.A., Peiser, C., Joachim, R.A., Frossard, N., Arck, P.C., Klapp, B.F., and Fischer, A. (2005). Expression of substance P and nitric oxide synthase in vagal sensory neurons innervating the mouse airways. *Regul. Pept.* 126, 189–194.

Dinh, Q.T., Klapp, B.F., and Fischer, A. (2006a). [Airway sensory nerve and tachykinins in asthma and COPD]. *Pneumol. Stuttg. Ger.* 60, 80–85.

Dinh, Q.T., Klapp, B.F., and Fischer, A. (2006b). Die sensible Atemwegsinnervation und die Tachykinine bei Asthma und chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung (COPD). *Pneumologie* 60, 80–85.

Doidge, J.M., and Satchell, D.G. (1982). Adrenergic and non-adrenergic inhibitory nerves in mammalian airways. *J. Auton. Nerv. Syst.* 5, 83–99.

Domoto, T., Yang, H., Bishop, A.E., Polak, J.M., and Oki, M. (1992). Distribution and origin of extrinsic nerve fibers containing calcitonin gene-related peptide, substance P and galanin in the rat upper rectum. *Neurosci. Res.* 15, 64–73.

Donaldson, L.F., Haskell, C.A., and Hanley, M.R. (1996). Functional characterization by heterologous expression of a novel cloned tachykinin peptide receptor. *Biochem. J.* 320 (Pt 1), 1–5.

Donoso, M.V., Brown, N., Carrasco, C., Cortes, V., Fournier, A., and Huidobro-Toro, J.P. (1997). Stimulation of the sympathetic perimesenteric arterial nerves releases neuropeptide Y potentiating the vasomotor activity of noradrenaline: involvement of neuropeptide Y-Y1 receptors. *J. Neurochem.* 69, 1048–1059.

Doran, J.F., Jackson, P., Kynoch, P.A., and Thompson, R.J. (1983). Isolation of PGP 9.5, a new human neurone-specific protein detected by high-resolution two-dimensional electrophoresis. *J. Neurochem.* 40, 1542–1547.

Dötsch, J., Hänze, J., Dittrich, K., Demirakça, S., Haberberger, R., and Rascher, W. (1997). Stimulation of neuropeptide Y release in rat pheochromocytoma cells by nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol.* 331, 313–317.

- Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T.L., and Sussman, J.L. (2010). Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chem. Biol. Interact.* 187, 10–22.
- Dzurik, M.V., Diedrich, A., Black, B., Paranjape, S.Y., Raj, S.R., Byrne, D.W., and Robertson, D. (2007). Endogenous substance P modulates human cardiovascular regulation at rest and during orthostatic load. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 102, 2092–2097.
- Edyvane, K.A., Smet, P.J., Trussell, D.C., Jonavicius, J., and Marshall, V.R. (1994). Patterns of neuronal colocalisation of tyrosine hydroxylase, neuropeptide Y, vasoactive intestinal polypeptide, calcitonin gene-related peptide and substance P in human ureter. *J. Auton. Nerv. Syst.* 48, 241–255.
- Ekblad, E., Edvinsson, L., Wahlestedt, C., Uddman, R., Håkanson, R., and Sundler, F. (1984). Neuropeptide Y co-exists and co-operates with noradrenaline in perivascular nerve fibers. *Regul. Pept.* 8, 225–235.
- El-Bermani, A.W., and Grant, M. (1975). Acetylcholinesterase-positive nerves of the rhesus monkey bronchial tree. *Thorax* 30, 162–170.
- El-Bermani, A.W., Bloomquist, E.I., and Montvilo, J.A. (1982). Distribution of pulmonary cholinergic nerves in the rabbit. *Thorax* 37, 703–710.
- Elfvin, L.G., Holmberg, K., Emson, P., Schemann, M., and Hökfelt, T. (1997). Nitric oxide synthase, choline acetyltransferase, catecholamine enzymes and neuropeptides and their colocalization in the anterior pelvic ganglion, the inferior mesenteric ganglion and the hypogastric nerve of the male guinea pig. *J. Chem. Neuroanat.* 14, 33–49.
- Emeson, R.B., Hedjran, F., Yeakley, J.M., Guise, J.W., and Rosenfeld, M.G. (1989). Alternative production of calcitonin and CGRP mRNA is regulated at the calcitonin-specific splice acceptor. *Nature* 341, 76–80.
- Ergün, Y., Ogülener, N., and Dikmen, A. (2001). Involvement of nitric oxide in non-adrenergic non-cholinergic relaxation and action of vasoactive intestinal polypeptide in circular muscle strips of the rat gastric fundus. *Pharmacol. Res. Off. J. Ital. Pharmacol. Soc.* 44, 221–228.
- Erickson, J.D., Varoqui, H., Schäfer, M.K., Modi, W., Diebler, M.F., Weihe, E., Rand, J., Eiden, L.E., Bonner, T.I., and Usdin, T.B. (1994). Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a “cholinergic” gene locus. *J. Biol. Chem.* 269, 21929–21932.
- Esplugues, J.V. (2002). NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br. J. Pharmacol.* 135, 1079–1095.
- Fischer, A., and Hoffmann, B. (1996). Nitric oxide synthase in neurons and nerve fibers of lower airways and in vagal sensory ganglia of man. Correlation with neuropeptides. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154, 209–216.
- Fischer, A., Kummer, W., Couraud, J.Y., Adler, D., Branscheid, D., and Heym, C. (1992). Immunohistochemical localization of receptors for vasoactive intestinal peptide and substance P in human trachea. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 67, 387–393.

- Fischer, A., Mundel, P., Mayer, B., Preissler, U., Philippin, B., and Kummer, W. (1993a). Nitric oxide synthase in guinea pig lower airway innervation. *Neurosci. Lett.* *149*, 157–160.
- Fischer, A., Mundel, P., Mayer, B., Preissler, U., Philippin, B., and Kummer, W. (1993b). Nitric oxide synthase in guinea pig lower airway innervation. *Neurosci. Lett.* *149*, 157–160.
- Fischer, A., Canning, B.J., and Kummer, W. (1996a). Correlation of vasoactive intestinal peptide and nitric oxide synthase with choline acetyltransferase in the airway innervation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *805*, 717–722.
- Fischer, A., McGregor, G.P., Saria, A., Philippin, B., and Kummer, W. (1996b). Induction of tachykinin gene and peptide expression in guinea pig nodose primary afferent neurons by allergic airway inflammation. *J. Clin. Invest.* *98*, 2284–2291.
- Fischer, A., Mayer, B., and Kummer, W. (1996c). Nitric oxide synthase in vagal sensory and sympathetic neurons innervating the guinea-pig trachea. *J. Auton. Nerv. Syst.* *56*, 157–160.
- Fischer, A., Canning, B.J., Undem, B.J., and Kummer, W. (1998). Evidence for an esophageal origin of VIP-IR and NO synthase-IR nerves innervating the guinea pig trachealis: a retrograde neuronal tracing and immunohistochemical analysis. *J. Comp. Neurol.* *394*, 326–334.
- Fischer, A., Folkerts, G., Geppetti, P., and Groneberg, D.A. (2002). Mediators of asthma: nitric oxide. *Pulm. Pharmacol. Ther.* *15*, 73–81.
- Fontán, J.J., Cortright, D.N., Krause, J.E., Velloff, C.R., Karpitskyi, V.V., Carver, T.W., Shapiro, S.D., and Mora, B.N. (2000). Substance P and neurokinin-1 receptor expression by intrinsic airway neurons in the rat. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *278*, L344–L355.
- Förstermann, U., Closs, E.I., Pollock, J.S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I., and Kleinert, H. (1994). Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* *23*, 1121–1131.
- Franco-Cereceda, A., and Lundberg, J.M. (1985). Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and capsaicin-induced stimulation of heart contractile rate and force. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* *331*, 146–151.
- Franco-Cereceda, A., and Lundberg, J.M. (1988). Actions of calcitonin gene-related peptide and tachykinins in relation to the contractile effects of capsaicin in the guinea-pig and rat heart in vitro. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* *337*, 649–655.
- Franco-Cereceda, A., Lundberg, J.M., and Dahlöf, C. (1985). Neuropeptide Y and sympathetic control of heart contractility and coronary vascular tone. *Acta Physiol. Scand.* *124*, 361–369.
- Franco-Cereceda, A., Gennari, C., Nami, R., Agnusdei, D., Pernow, J., Lundberg, J.M., and Fischer, J.A. (1987). Cardiovascular effects of calcitonin gene-related peptides I and II in man. *Circ. Res.* *60*, 393–397.

- Franco-Cereceda, A., Lundberg, J.M., Saria, A., Schreiber, W., and Tritthart, H.A. (1988). Calcitonin gene-related peptide: release by capsaicin and prolongation of the action potential in the guinea-pig heart. *Acta Physiol. Scand.* 132, 181–190.
- Franco-Cereceda, A., Matran, R., Alving, K., and Lundberg, J.M. (1995). Sympathetic vascular control of the laryngeal-tracheal, bronchial and pulmonary circulation in the pig: evidence for non-adrenergic mechanisms involving neuropeptide Y. *Acta Physiol. Scand.* 155, 193–204.
- Freedman, J.E., and Keaney, J.F. (1999). Nitric oxide and superoxide detection in human platelets. *Methods Enzymol.* 301, 61–70.
- Freedman, J.E., Sauter, R., Battinelli, E.M., Ault, K., Knowles, C., Huang, P.L., and Loscalzo, J. (1999). Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene. *Circ. Res.* 84, 1416–1421.
- Frossard, N., and Advenier, C. (1991). Tachykinin receptors and the airways. *Life Sci.* 49, 1941–1953.
- Frossard, N., and Barnes, J. (1991). Effect of tachykinins in small human airways. *Neuropeptides* 19, 157–161.
- Furchgott, R.F., and Zawadzki, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373–376.
- Gautam, D., Duttaroy, A., Cui, Y., Han, S.-J., Deng, C., Seeger, T., Alzheimer, C., and Wess, J. (2006). M1-M3 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice: novel phenotypes. *J. Mol. Neurosci.* MN 30, 157–160.
- Ghatta, S., and Nimmagadda, D. (2004). Calcitonin gene-related peptide: Understanding its role. *Indian J. Pharmacol.*
- Goetzl, E.J., Pankhaniya, R.R., Gaufo, G.O., Mu, Y., Xia, M., and Sreedharan, S.P. (1998). Selectivity of effects of vasoactive intestinal peptide on macrophages and lymphocytes in compartmental immune responses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 840, 540–550.
- Gosens, R., Zaagsma, J., Grootte Bromhaar, M., Nelemans, A., and Meurs, H. (2004). Acetylcholine: a novel regulator of airway smooth muscle remodelling? *Eur. J. Pharmacol.* 500, 193–201.
- Gosens, R., Zaagsma, J., Meurs, H., and Halayko, A.J. (2006). Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir. Res.* 7, 73.
- Gotti, C., Fornasari, D., and Clementi, F. (1997). Human neuronal nicotinic receptors. *Prog. Neurobiol.* 53, 199–237.
- Gozes, I., and Brenneman, D.E. (1989). VIP: molecular biology and neurobiological function. *Mol. Neurobiol.* 3, 201–236.
- Grando, S.A., Kawashima, K., Kirkpatrick, C.J., and Wessler, I. (2007). Recent progress in understanding the non-neuronal cholinergic system in humans. *Life Sci.* 80, 2181–2185.

- Gray, T.S., and Morley, J.E. (1986). Neuropeptide Y: anatomical distribution and possible function in mammalian nervous system. *Life Sci.* 38, 389–401.
- Green, J.F., Schmidt, N.D., Schultz, H.D., Roberts, A.M., Coleridge, H.M., and Coleridge, J.C. (1984). Pulmonary C-fibers evoke both apnea and tachypnea of pulmonary chemoreflex. *J. Appl. Physiol.* 57, 562–567.
- Groneberg, D.A., Springer, J., and Fischer, A. (2001). Vasoactive intestinal polypeptide as mediator of asthma. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 14, 391–401.
- Groneberg, D.A., Rabe, K.F., Wagner, U., and Fischer, A. (2004). [Vasoactive intestinal polypeptide in the respiratory tract: physiology and pathophysiology]. *Pneumol. Stuttg. Ger.* 58, 330–338.
- Groth, M., Helbig, T., Grau, V., Kummer, W., and Haberberger, R.V. (2006). Spinal afferent neurons projecting to the rat lung and pleura express acid sensitive channels. *Respir. Res.* 7, 96.
- Grundemar, L., Widmark, E., Waldeck, B., and Håkanson, R. (1988). Neuropeptide Y: prejunctional inhibition of vagally induced contractions in the guinea pig trachea. *Regul. Pept.* 23, 309–313.
- Gu, J., Polak, J.M., Adrian, T.E., Allen, J.M., Tatemoto, K., and Bloom, S.R. (1983). Neuropeptide tyrosine (NPY)--a major cardiac neuropeptide. *Lancet* 1, 1008–1010.
- Gu, J., Polak, J.M., Allen, J.M., Huang, W.M., Sheppard, M.N., Tatemoto, K., and Bloom, S.R. (1984). High concentrations of a novel peptide, neuropeptide Y, in the innervation of mouse and rat heart. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 32, 467–472.
- Gulbenkian, S., Wharton, J., and Polak, J.M. (1987). The visualisation of cardiovascular innervation in the guinea pig using an antiserum to protein gene product 9.5 (PGP 9.5). *J. Auton. Nerv. Syst.* 18, 235–247.
- Guz, A., and Trenchard, D.W. (1971a). Pulmonary stretch receptor activity in man: a comparison with dog and cat. *J. Physiol.* 213, 329–343.
- Guz, A., and Trenchard, D.W. (1971b). Pulmonary stretch receptor activity in man: a comparison with dog and cat. *J. Physiol.* 213, 329–343.
- Haberberger, R., Schemann, M., Sann, H., and Kummer, W. (1997). Innervation pattern of guinea pig pulmonary vasculature depends on vascular diameter. *J. Appl. Physiol.* 82, 426–434.
- Hamasaki, Y., Mojarad, M., and Said, S.I. (1983). Relaxant action of VIP on cat pulmonary artery: comparison with acetylcholine, isoproterenol, and PGE1. *J. Appl. Physiol.* 54, 1607–1611.
- Han, S., Yang, C.L., Chen, X., Naes, L., Cox, B.F., and Westfall, T. (1998). Direct evidence for the role of neuropeptide Y in sympathetic nerve stimulation-induced vasoconstriction. *Am. J. Physiol.* 274, H290–H294.

Harmar, A.J., Hyde, V., and Chapman, K. (1990). Identification and cDNA sequence of delta-preprotachykinin, a fourth splicing variant of the rat substance P precursor. *FEBS Lett.* 275, 22–24.

Hassall, C.J., Saffrey, M.J., Belai, A., Hoyle, C.H., Moules, E.W., Moss, J., Schmidt, H.H., Murad, F., Förstermann, U., and Burnstock, G. (1992). Nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH-diaphorase activity in a subpopulation of intrinsic neurones of the guinea-pig heart. *Neurosci. Lett.* 143, 65–68.

Hegde, S.S., and Eglén, R.M. (1999). Muscarinic receptor subtypes modulating smooth muscle contractility in the urinary bladder. *Life Sci.* 64, 419–428.

Helke, C.J., Krause, J.E., Mantyh, P.W., Couture, R., and Bannon, M.J. (1990). Diversity in mammalian tachykinin peptidergic neurons: multiple peptides, receptors, and regulatory mechanisms. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 4, 1606–1615.

Henning, R.J., and Sawmiller, D.R. (2001). Vasoactive intestinal peptide: cardiovascular effects. *Cardiovasc. Res.* 49, 27–37.

Hino, N., Masuko, S., and Katsuki, T. (1993). An immunohistochemical study of sensory and autonomic innervation of the dog tongue with special reference to substance P- and calcitonin gene-related peptide-containing fibers in blood vessels and the intraligular ganglia. *Arch. Histol. Cytol.* 56, 505–516.

Hökfelt, T., Broberger, C., Zhang, X., Diez, M., Kopp, J., Xu, Z., Landry, M., Bao, L., Schalling, M., Koistinaho, J., et al. (1998). Neuropeptide Y: some viewpoints on a multifaceted peptide in the normal and diseased nervous system. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 26, 154–166.

Hollenberg, M.D. (1986). Mechanisms of receptor-mediated transmembrane signalling. *Experientia* 42, 718–727.

Hongbao, M., Yan, Y., and Shen, C. (2009). Gender-specific effects of calcitonin gene-related peptide and substance P on coronary blood flow in an experimental model. *Angiology* 60, 569–575.

Hoover, D.B. (1989). Effects of guinea pig vasoactive intestinal peptide on the isolated perfused guinea pig heart. *Peptides* 10, 343–347.

Hoover, D.B., and Hancock, J.C. (1988). Distribution of substance P binding sites in guinea-pig heart and pharmacological effects of substance P. *J. Auton. Nerv. Syst.* 23, 189–197.

Hopkins, D.A., and Armour, J.A. (1984). Localization of sympathetic postganglionic and parasympathetic preganglionic neurons which innervate different regions of the dog heart. *J. Comp. Neurol.* 229, 186–198.

Hua, X.Y., Theodorsson-Norheim, E., Brodin, E., Lundberg, J.M., and Hökfelt, T. (1985). Multiple tachykinins (neurokinin A, neuropeptide K and substance P) in capsaicin-sensitive sensory neurons in the guinea-pig. *Regul. Pept.* 13, 1–19.

- Ichikawa, T., Ajiki, K., Matsuura, J., and Misawa, H. (1997). Localization of two cholinergic markers, choline acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter in the central nervous system of the rat: in situ hybridization histochemistry and immunohistochemistry. *J. Chem. Neuroanat.* *13*, 23–39.
- Inoue, H., Aizawa, H., Ikeda, T., Matsuzaki, Y., and Hirose, T. (1992). [Nonadrenergic noncholinergic inhibitory nervous system in guinea pig airway]. *Nihon Kyōbu Shikkan Gakkai Zasshi* *30*, 248–255.
- Israël, M., and Dunant, Y. (1998). Acetylcholine release and the cholinergic genomic locus. *Mol. Neurobiol.* *16*, 1–20.
- Israël, M., and Dunant, Y. (1999). Mediatophore, a protein supporting quantal acetylcholine release. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* *77*, 689–698.
- Ito, T., Hioki, H., Nakamura, K., Tanaka, Y., Nakade, H., Kaneko, T., Iino, S., and Nojyo, Y. (2007). Gamma-aminobutyric acid-containing sympathetic preganglionic neurons in rat thoracic spinal cord send their axons to the superior cervical ganglion. *J. Comp. Neurol.* *502*, 113–125.
- Itoh, H., Sakai, J., Imoto, A., and Creed, K.E. (1995). [The control of smooth muscle tissues by nonadrenergic noncholinergic (NANC) nerve fibres in the autonomic nervous system]. *J. Smooth Muscle Res. Nihon Heikatsukin Gakkai Kikanshi* *31*, 67–78.
- Iversen, L.L., Hanley, M.R., Sandberg, B.E., Lee, C.M., Pinnock, R.D., and Watson, S.P. (1982). Substance P receptors in the nervous system and possible receptor subtypes. *Ciba Found. Symp.* 186–205.
- Jackson, P., and Thompson, R.J. (1981). The demonstration of new human brain-specific proteins by high-resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Neurol. Sci.* *49*, 429–438.
- Järvi, R., Helén, P., Peltö-Huikko, M., and Hervonen, A. (1986). Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in rat sympathetic neurons and small granule-containing cells. *Neurosci. Lett.* *67*, 223–227.
- Jeck, D., Lindmar, R., Löffelholz, K., and Wanke, M. (1988). Subtypes of muscarinic receptor on cholinergic nerves and atrial cells of chicken and guinea-pig hearts. *Br. J. Pharmacol.* *93*, 357–366.
- Jing, L., Inoue, R., Tashiro, K., Takahashi, S., and Ito, Y. (1995). Role of nitric oxide in non-adrenergic, non-cholinergic relaxation and modulation of excitatory neuroeffector transmission in the cat airway. *J. Physiol.* *483* (Pt 1), 225–237.
- Joachim, R.A., Cifuentes, L.B., Sagach, V., Quarcoo, D., Hagen, E., Arck, P.C., Fischer, A., Klapp, B.F., and Dinh, Q.T. (2006). Stress induces substance P in vagal sensory neurons innervating the mouse airways. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* *36*, 1001–1010.
- Joos, G.F. (2001). The role of neuroeffector mechanisms in the pathogenesis of asthma. *Curr. Allergy Asthma Rep.* *1*, 134–143.

Joos, G., Kips, J., Pauwels, R., and Van der Straeten, M. (1986). The respiratory effects of neuropeptides. *Eur. J. Respir. Dis. Suppl.* 144, 107–136.

Joos, G.F., Germonpre, P.R., Kips, J.C., Peleman, R.A., and Pauwels, R.A. (1994). Sensory neuropeptides and the human lower airways: present state and future directions. *Eur. Respir. J.* 7, 1161–1171.

Ju, G., Hökfelt, T., Brodin, E., Fahrenkrug, J., Fischer, J.A., Frey, P., Elde, R.P., and Brown, J.C. (1987). Primary sensory neurons of the rat showing calcitonin gene-related peptide immunoreactivity and their relation to substance P-, somatostatin-, galanin-, vasoactive intestinal polypeptide- and cholecystokinin-immunoreactive ganglion cells. *Cell Tissue Res.* 247, 417–431.

Kajekar, R., and Myers, A.C. (2008). Calcitonin gene-related peptide affects synaptic and membrane properties of bronchial parasympathetic neurons. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 160, 28–36.

Kapadia, S.E., and de Lanerolle, N.C. (1984). Substance P neuronal organization in the median region of the interpeduncular nucleus of the cat: an electron microscopic analysis. *Neuroscience* 12, 1229–1242.

Keith, I.M., Pelto-Huikko, M., Schalling, M., and Hökfelt, T. (1991). Calcitonin gene-related peptide and its mRNA in pulmonary neuroendocrine cells and ganglia. *Histochemistry* 96, 311–315.

Kelly, R.A., Balligand, J.L., and Smith, T.W. (1996a). Nitric oxide and cardiac function. *Circ. Res.* 79, 363–380.

Kelly, R.A., Balligand, J.-L., and Smith, T.W. (1996b). Nitric Oxide and Cardiac Function. *Circ. Res.* 79, 363–380.

Kelm, M., and Schrader, J. (1988). Nitric oxide release from the isolated guinea pig heart. *Eur. J. Pharmacol.* 155, 317–321.

Kelm, M., and Schrader, J. (1990). Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ. Res.* 66, 1561–1575.

Kennedy, A.L., Harakall, S.A., Lynch, S.W., Braas, K.M., Hardwick, J.C., Mawe, G.M., and Parsons, R.L. (1998). Expression and physiological actions of neuropeptide Y in guinea pig parasympathetic cardiac ganglia. *J. Auton. Nerv. Syst.* 71, 190–195.

Kirkpatrick, C.J., Bittinger, F., Unger, R.E., Kriegsmann, J., Kilbinger, H., and Wessler, I. (2001). The non-neuronal cholinergic system in the endothelium: evidence and possible pathobiological significance. *Jpn. J. Pharmacol.* 85, 24–28.

Kirkpatrick, C.J., Bittinger, F., Nozadze, K., and Wessler, I. (2003). Expression and function of the non-neuronal cholinergic system in endothelial cells. *Life Sci.* 72, 2111–2116.

Kittur, S.D., Hoppener, J.W., Antonarakis, S.E., Daniels, J.D., Meyers, D.A., Maestri, N.E., Jansen, M., Korneluk, R.G., Nelkin, B.D., and Kazazian, H.H. (1985). Linkage map of the short arm of human chromosome 11: location of the genes for catalase,

calcitonin, and insulin-like growth factor II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 5064–5067.

Klapproth, H., Reinheimer, T., Metzen, J., Münch, M., Bittinger, F., Kirkpatrick, C.J., Höhle, K.D., Schemann, M., Racké, K., and Wessler, I. (1997). Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 355, 515–523.

Klein, M.K., Haberberger, R.V., Hartmann, P., Faulhammer, P., Lips, K.S., Krain, B., Wess, J., Kummer, W., and König, P. (2009). Muscarinic receptor subtypes in cilia-driven transport and airway epithelial development. *Eur. Respir. J.* 33, 1113–1121.

Klimaschewski, L., Kummer, W., Mayer, B., Couraud, J.Y., Preissler, U., Philippin, B., and Heym, C. (1992). Nitric oxide synthase in cardiac nerve fibers and neurons of rat and guinea pig heart. *Circ. Res.* 71, 1533–1537.

Kneussl, M. (1986). [Regulation of the tracheobronchial and lung vascular system: innervation and receptors]. *Wien. Klin. Wochenschr.* 98, 7013–7025.

Koepsell, H., Lips, K., and Volk, C. (2007). Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm. Res.* 24, 1227–1251.

Kollarik, M., Dinh, Q.T., Fischer, A., and Udem, B.J. (2003). Capsaicin-sensitive and -insensitive vagal bronchopulmonary C-fibres in the mouse. *J. Physiol.* 551, 869–879.

Komatsu, T., Yamamoto, M., Shimokata, K., and Nagura, H. (1991). Distribution of substance P-immunoreactive and calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerves in normal human lungs. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 95, 23–28.

Kotani, Y., Hirota, Y., Sugiyama, K., Joh, S., Shibutani, T., Matsuura, H., and Inoki, R. (1986). Effects of noxious stimuli and anesthetic agents on substance P content in rat central nervous system. *Jpn. J. Pharmacol.* 40, 143–147.

Kulakowski, E.C., Lampson, W.G., Schaffer, S.W., and Lovenberg, W. (1983). Action of substance P on the working rat heart. *Biochem. Pharmacol.* 32, 1097–1100.

Kummer, W. (1992). Neuronal specificity and plasticity in the autonomic nervous system. *Ann. Anat. Anat. Anz. Off. Organ Anat. Ges.* 174, 409–417.

Kummer, W., Fischer, A., Kurkowski, R., and Heym, C. (1992a). The sensory and sympathetic innervation of guinea-pig lung and trachea as studied by retrograde neuronal tracing and double-labelling immunohistochemistry. *Neuroscience* 49, 715–737.

Kummer, W., Fischer, A., Kurkowski, R., and Heym, C. (1992b). The sensory and sympathetic innervation of guinea-pig lung and trachea as studied by retrograde neuronal tracing and double-labelling immunohistochemistry. *Neuroscience* 49, 715–737.

Kummer, W., Fischer, A., Mundel, P., Mayer, B., Hoba, B., Philippin, B., and Preissler, U. (1992c). Nitric oxide synthase in VIP-containing vasodilator nerve fibres in the guinea-pig. *Neuroreport* 3, 653–655.

Kummer, W., Lips, K.S. (2006). Non-neuronal acetylcholine release and its contribution to COPD pathology. *Drug Discov. Today Dis. Mech.* 3, 47–52.

Kummer, W., Lips, K.S., and Pfeil, U. (2008). The epithelial cholinergic system of the airways. *Histochem. Cell Biol.* 130, 219–234.

Kuo, H.P., Rohde, J.A., Barnes, P.J., and Rogers, D.F. (1992). K⁺ channel activator inhibition of neurogenic goblet cell secretion in guinea pig trachea. *Eur. J. Pharmacol.* 215, 297–299.

Kusindarta, D.L., Wijayanto, H., and Atoji, Y. (2003). Intrinsic innervation in the tracheal smooth muscle of the large flying fox (*Pteropus vampyrus*): an immunohistochemical study. *Eur. J. Morphol.* 41, 111–116.

Kusindarta, D.L., Atoji, Y., and Yamamoto, Y. (2004). Nerve plexuses in the trachea and extrapulmonary bronchi of the rat. *Arch. Histol. Cytol.* 67, 41–55.

Lacroix, J.S., Anggård, A., Hökfelt, T., O'Hare, M.M., Fahrenkrug, J., and Lundberg, J.M. (1990). Neuropeptide Y: presence in sympathetic and parasympathetic innervation of the nasal mucosa. *Cell Tissue Res.* 259, 119–128.

Laitinen, A. (1985). Autonomic innervation of the human respiratory tract as revealed by histochemical and ultrastructural methods. *Eur. J. Respir. Dis. Suppl.* 140, 1–42.

Laitinen, A., Partanen, M., Hervonen, A., Peltö-Huikko, M., and Laitinen, L.A. (1985). VIP like immunoreactive nerves in human respiratory tract. Light and electron microscopic study. *Histochemistry* 82, 313–319.

Laitinen, L.A., Laitinen, A., Salonen, R.O., and Widdicombe, J.G. (1987). Vascular actions of airway neuropeptides. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136, S59–S64.

Larhammar, D. (1996). Evolution of neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regul. Pept.* 62, 1–11.

Larhammar, D., Ericsson, A., and Persson, H. (1987). Structure and expression of the rat neuropeptide Y gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 2068–2072.

Larson, S.D., Schelegle, E.S., Hyde, D.M., and Plopper, C.G. (2003). The three-dimensional distribution of nerves along the entire intrapulmonary airway tree of the adult rat and the anatomical relationship between nerves and neuroepithelial bodies. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 28, 592–599.

Lauweryns, J.M., and Van Ranst, L. (1988). Protein gene product 9.5 expression in the lungs of humans and other mammals. Immunocytochemical detection in neuroepithelial bodies, neuroendocrine cells and nerves. *Neurosci. Lett.* 85, 311–316.

Lawrence, A.J., and Jarrott, B. (1996). Neurochemical modulation of cardiovascular control in the nucleus tractus solitarius. *Prog. Neurobiol.* 48, 21–53.

Leblanc, G.G., Trimmer, B.A., and Landis, S.C. (1987). Neuropeptide Y-like immunoreactivity in rat cranial parasympathetic neurons: coexistence with vasoactive intestinal peptide and choline acetyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 3511–3515.

- Lefebvre, R.A., Smits, G.J., and Timmermans, J.P. (1995). Study of NO and VIP as non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitters in the pig gastric fundus. *Br. J. Pharmacol.* *116*, 2017–2026.
- Lei, Y.H., Barnes, P.J., and Rogers, D.F. (1993). Regulation of NANC neural bronchoconstriction in vivo in the guinea-pig: involvement of nitric oxide, vasoactive intestinal peptide and soluble guanylyl cyclase. *Br. J. Pharmacol.* *108*, 228–235.
- Lichtman, J.W., Purves, D., and Yip, J.W. (1980). Innervation of sympathetic neurones in the guinea-pig thoracic chain. *J. Physiol.* *298*, 285–299.
- Lindén, A., Löfdahl, C.G., Ullman, A., and Skoogh, B.E. (1993). Nonadrenergic, noncholinergic responses stabilize smooth muscle tone, with and without parasympathetic activation, in guinea-pig isolated airways. *Eur. Respir. J.* *6*, 425–433.
- Lindh, B., and Hökfelt, T. (1990). Structural and functional aspects of acetylcholine peptide coexistence in the autonomic nervous system. *Prog. Brain Res.* *84*, 175–191.
- Lindh, B., Staines, W., Hökfelt, T., Terenius, L., and Salvaterra, P.M. (1986a). Immunohistochemical demonstration of choline acetyltransferase-immunoreactive preganglionic nerve fibers in guinea pig autonomic ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *83*, 5316–5320.
- Lindh, B., Hökfelt, T., Elfvin, L.G., Terenius, L., Fahrenkrug, J., Elde, R., and Goldstein, M. (1986b). Topography of NPY-, somatostatin-, and VIP-immunoreactive, neuronal subpopulations in the guinea pig celiac-superior mesenteric ganglion and their projection to the pylorus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *6*, 2371–2383.
- Lindh, B., Lundberg, J.M., and Hökfelt, T. (1989). NPY-, galanin-, VIP/PHI-, CGRP- and substance P-immunoreactive neuronal subpopulations in cat autonomic and sensory ganglia and their projections. *Cell Tissue Res.* *256*, 259–273.
- Lindstrom, J., Anand, R., Gerzanich, V., Peng, X., Wang, F., and Wells, G. (1996). Structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Prog. Brain Res.* *109*, 125–137.
- Lips, K.S., Brüggmann, D., Pfeil, U., Vollerthun, R., Grando, S.A., and Kummer, W. (2005a). Nicotinic acetylcholine receptors in rat and human placenta. *Placenta* *26*, 735–746.
- Lips, K.S., Volk, C., Schmitt, B.M., Pfeil, U., Arndt, P., Miska, D., Ermert, L., Kummer, W., and Koepsell, H. (2005b). Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *33*, 79–88.
- Lips, K.S., Wunsch, J., Zarghooni, S., Bschleipfer, T., Schukowski, K., Weidner, W., Wessler, I., Schwantes, U., Koepsell, H., and Kummer, W. (2007). Acetylcholine and molecular components of its synthesis and release machinery in the urothelium. *Eur. Urol.* *51*, 1042–1053.
- Liu, A., Pichard, L., Schneider, H., Patil, S.P., Smith, P.L., Polotsky, V., and Schwartz, A.R. (2008). Neuromechanical control of the isolated upper airway of mice. *J. Appl. Physiol.* *105*, 1237–1245.

Llewellyn-Smith, I.J., Pilowsky, P., Minson, J.B., and Chalmers, J. (1995). Synapses on axons of sympathetic preganglionic neurons in rat and rabbit thoracic spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 354, 193–208.

Loyer, X., Samuel, J.L., and Heymes, C. (2005). Cardiac myocyte neuronal nitric oxide synthase. New therapeutic target in heart failure? *Arch. Mal. Coeur Vaiss.* 98, 1244–1248.

List, J.E. (2011). Die cholinerge und nicht-cholinerge Innervation der Thoraxorgane der Ratte. Gießen, Univ., Diss.

Lukas, R.J., Changeux, J.P., Le Novère, N., Albuquerque, E.X., Balfour, D.J., Berg, D.K., Bertrand, D., Chiappinelli, V.A., Clarke, P.B., Collins, A.C., et al. (1999). International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacol. Rev.* 51, 397–401.

Lumme, A., Vanhatalo, S., and Soinila, S. (1996). Axonal transport of nitric oxide synthase in autonomic nerves. *J. Auton. Nerv. Syst.* 56, 207–214.

Lundberg, J.M., and Tatemoto, K. (1982). Pancreatic polypeptide family (APP, BPP, NPY and PYY) in relation to sympathetic vasoconstriction resistant to alpha-adrenoceptor blockade. *Acta Physiol. Scand.* 116, 393–402.

Lundberg, J.M., Anggård, A., Fahrenkrug, J., Hökfelt, T., and Mutt, V. (1980). Vasoactive intestinal polypeptide in cholinergic neurons of exocrine glands: functional significance of coexisting transmitters for vasodilation and secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 1651–1655.

Lundberg, J.M., Anggård, A., Emson, P., Fahrenkrug, J., and Hökfelt, T. (1981). Vasoactive intestinal polypeptide and cholinergic mechanisms in cat nasal mucosa: studies on choline acetyltransferase and release of vasoactive intestinal polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 5255–5259.

Lundberg, J.M., Terenius, L., Hökfelt, T., and Goldstein, M. (1983a). High levels of neuropeptide Y in peripheral noradrenergic neurons in various mammals including man. *Neurosci. Lett.* 42, 167–172.

Lundberg, J.M., Martling, C.R., and Saria, A. (1983b). Substance P and capsaicin-induced contraction of human bronchi. *Acta Physiol. Scand.* 119, 49–53.

Lundberg, J.M., Hökfelt, T., Martling, C.R., Saria, A., and Cuello, C. (1984a). Substance P-immunoreactive sensory nerves in the lower respiratory tract of various mammals including man. *Cell Tissue Res.* 235, 251–261.

Lundberg, J.M., Terenius, L., Hökfelt, T., and Tatemoto, K. (1984b). Comparative immunohistochemical and biochemical analysis of pancreatic polypeptide-like peptides with special reference to presence of neuropeptide Y in central and peripheral neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 4, 2376–2386.

Lundberg, J.M., Hökfelt, T., Martling, C.R., Saria, A., and Cuello, C. (1984c). Substance P-immunoreactive sensory nerves in the lower respiratory tract of various mammals including man. *Cell Tissue Res.* 235, 251–261.

- Lundberg, J.M., Franco-Cereceda, A., Hua, X., Hökfelt, T., and Fischer, J.A. (1985a). Co-existence of substance P and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivities in sensory nerves in relation to cardiovascular and bronchoconstrictor effects of capsaicin. *Eur. J. Pharmacol.* *108*, 315–319.
- Lundberg, J.M., Torssell, L., Sollevi, A., Pernow, J., Theodorsson Norheim, E., Anggård, A., and Hamberger, B. (1985b). Neuropeptide Y and sympathetic vascular control in man. *Regul. Pept.* *13*, 41–52.
- Lundberg, J.M., Fried, G., Pernow, J., and Theodorsson-Norheim, E. (1986). Co-release of neuropeptide Y and catecholamines upon adrenal activation in the cat. *Acta Physiol. Scand.* *126*, 231–238.
- Lundberg, J.M., Hemsén, A., Rudehill, A., Härfstrand, A., Larsson, O., Sollevi, A., Saria, A., Hökfelt, T., Fuxe, K., and Fredholm, B.B. (1988). Neuropeptide Y- and alpha-adrenergic receptors in pig spleen: localization, binding characteristics, cyclic AMP effects and functional responses in control and denervated animals. *Neuroscience* *24*, 659–672.
- Lundberg, J.M., Franco-Cereceda, A., Lacroix, J.S., and Pernow, J. (1990). Neuropeptide Y and sympathetic neurotransmission. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *611*, 166–174.
- Lundberg, J.M., Franco-Cereceda, A., Lacroix, J.S., and Pernow, J. (1991). Release of vasoactive peptides from autonomic and sensory nerves. *Blood Vessels* *28*, 27–34.
- Lundberg, J.M., Franco-Cereceda, A., Alving, K., Delay-Goyet, P., and Lou, Y.P. (1992). Release of calcitonin gene-related peptide from sensory neurons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *657*, 187–193.
- Lundberg, J.M., Franco-Cereceda, A., Lou, Y.P., Modin, A., and Pernow, J. (1994). Differential release of classical transmitters and peptides. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* *29*, 223–234.
- Maggi, C.A., Giachetti, A., Dey, R.D., and Said, S.I. (1995). Neuropeptides as regulators of airway function: vasoactive intestinal peptide and the tachykinins. *Physiol. Rev.* *75*, 277–322.
- Maggio, J.E., and Hunter, J.C. (1984). Regional distribution of kassinin-like immunoreactivity in rat central and peripheral tissues and the effect of capsaicin. *Brain Res.* *307*, 370–373.
- Malmström, R.E. (1997). Neuropeptide Y Y1 receptor mechanisms in sympathetic vascular control. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* *636*, 1–55.
- Manso, A.M., Encabo, A., Redondo, J., Salaices, M., and Marín, J. (2000). Different sensitivity of isoprenaline-induced responses in ventricular muscle to sodium nitroprusside in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J. Auton. Pharmacol.* *20*, 77–85.
- Manzini, S., Perretti, F., De Benedetti, L., Pradelles, P., Maggi, C.A., and Geppetti, P. (1989). A comparison of bradykinin- and capsaicin-induced myocardial and coronary

effects in isolated perfused heart of guinea-pig: involvement of substance P and calcitonin gene-related peptide release. *Br. J. Pharmacol.* 97, 303–312.

Di Maria, G.U., Bellofiore, S., and Geppetti, P. (1998). Regulation of airway neurogenic inflammation by neutral endopeptidase. *Eur. Respir. J.* 12, 1454–1462.

Marron, K., Wharton, J., Sheppard, M.N., Gulbenkian, S., Royston, D., Yacoub, M.H., Anderson, R.H., and Polak, J.M. (1994). Human endocardial innervation and its relationship to the endothelium: an immunohistochemical, histochemical, and quantitative study. *Cardiovasc. Res.* 28, 1490–1499.

Martling, C.R. (1987). Sensory nerves containing tachykinins and CGRP in the lower airways. Functional implications for bronchoconstriction, vasodilatation and protein extravasation. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 563, 1–57.

Martling, C.R., Saria, A., Fischer, J.A., Hökfelt, T., and Lundberg, J.M. (1988). Calcitonin gene-related peptide and the lung: neuronal coexistence with substance P, release by capsaicin and vasodilatory effect. *Regul. Pept.* 20, 125–139.

Martling, C.R., Matran, R., Alving, K., Lacroix, J.S., and Lundberg, J.M. (1989). Vagal vasodilatory mechanisms in the pig bronchial circulation preferentially involves sensory nerves. *Neurosci. Lett.* 96, 306–311.

Martling, C.R., Matran, R., Alving, K., Hökfelt, T., and Lundberg, J.M. (1990). Innervation of lower airways and neuropeptide effects on bronchial and vascular tone in the pig. *Cell Tissue Res.* 260, 223–233.

Matran, R. (1991). Neural control of lower airway vasculature. Involvement of classical transmitters and neuropeptides. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 601, 1–54.

Matran, R., Martling, C.R., and Lundberg, J.M. (1989). Inhibition of cholinergic and non-adrenergic, non-cholinergic bronchoconstriction in the guinea pig mediated by neuropeptide Y and alpha 2-adrenoceptors and opiate receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 163, 15–23.

Matsuura, J., Ajiki, K., Ichikawa, T., and Misawa, H. (1997a). Changes of expression levels of choline acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter mRNAs after transection of the hypoglossal nerve in adult rats. *Neurosci. Lett.* 236, 95–98.

Matsuura, J., Ajiki, K., Ichikawa, T., and Misawa, H. (1997b). Changes of expression levels of choline acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter mRNAs after transection of the hypoglossal nerve in adult rats. *Neurosci. Lett.* 236, 95–98.

Matthews, M.R., and Cuello, A.C. (1984). The origin and possible significance of substance P immunoreactive networks in the prevertebral ganglia and related structures in the guinea-pig. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 306, 247–276.

Mawe, G.M., Talmage, E.K., Lee, K.P., and Parsons, R.L. (1996). Expression of choline acetyltransferase immunoreactivity in guinea pig cardiac ganglia. *Cell Tissue Res.* 285, 281–286.

Mayer, B., Schmidt, K., Humbert, P., and Böhme, E. (1989). Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial

cells Ca^{2+} -dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 678–685.

Mazzone, S.B., and Canning, B.J. (2013). Autonomic neural control of the airways. *Handb. Clin. Neurol.* 117, 215–228.

Melikian, N., Seddon, M.D., Casadei, B., Chowienzyk, P.J., and Shah, A.M. (2009). Neuronal nitric oxide synthase and human vascular regulation. *Trends Cardiovasc. Med.* 19, 256–262.

Merighi, A., Kar, S., Gibson, S.J., Ghidella, S., Gobetto, A., Peirone, S.M., and Polak, J.M. (1990). The immunocytochemical distribution of seven peptides in the spinal cord and dorsal root ganglia of horse and pig. *Anat. Embryol. (Berl.)* 181, 271–280.

Ming, Z., and Wang, D.X. (1989). Sympathetic innervation of pulmonary circulation and its role in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J. Tongji Med. Univ. Tong Ji Yi Ke Xue Xue Bao* 9, 153–159.

Mis, K. (2005). Colocalization of acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and choline acetyltransferase in rat spinal cord. *Hum. Exp. Toxicol.* 24, 543–545.

Modin, A. (1994). Non-adrenergic, non-cholinergic vascular control with reference to neuropeptide Y, vasoactive intestinal polypeptide and nitric oxide. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 622, 1–74.

Modin, A., Weitzberg, E., Hökfelt, T., and Lundberg, J.M. (1994). Nitric oxide synthase in the pig autonomic nervous system in relation to the influence of NG--nitro-L-arginine on sympathetic and parasympathetic vascular control in vivo. *Neuroscience* 62, 189–203.

Moffatt, J.D., Dumsday, B., and McLean, J.R. (1998). Non-adrenergic, non-cholinergic neurons innervating the guinea-pig trachea are located in the oesophagus: evidence from retrograde neuronal tracing. *Neurosci. Lett.* 248, 37–40.

Moffatt, J.D., Dumsday, B., and McLean, J.R. (1999). Characterization of non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory responses of the isolated guinea-pig trachea: differences between pre- and post-ganglionic nerve stimulation. *Br. J. Pharmacol.* 128, 458–464.

Moncada, S., Palmer, R.M., and Higgs, E.A. (1989). Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol.* 38, 1709–1715.

Morris, J.L., and Gibbins, I.L. (1989). Co-localization and plasticity of transmitters in peripheral autonomic and sensory neurons. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 7, 521–531.

Morris, H.R., Panico, M., Etienne, T., Tippins, J., Girgis, S.I., and MacIntyre, I. (1984). Isolation and characterization of human calcitonin gene-related peptide. *Nature* 308, 746–748.

Nadel, J.A. (1990). Neutral endopeptidase modulation of neurogenic inflammation in airways. *Eur. Respir. J. Suppl.* 12, 645s – 651s.

- Nadel, J.A., and Widdicombe, J.G. (1962). Effect of changes in blood gas tensions and carotid sinus pressure on tracheal volume and total lung resistance to airflow. *J. Physiol.* 163, 13–33.
- Nandiwada, P.A., Kadowitz, P.J., Said, S.I., Mojarad, M., and Hyman, A.L. (1985). Pulmonary vasodilator responses to vasoactive intestinal peptide in the cat. *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 1985 58, 1723–1728.
- Oda, Y. (1999). Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol. Int.* 49, 921–937.
- Oehler, J. (2003). Die nichtadrenerge-nichtcholinerge Innervation der Thoraxorgane des Meerschweinchens. Gießen, Univ., Diss.
- Okuda, T., Haga, T., Kanai, Y., Endou, H., Ishihara, T., and Katsura, I. (2000). Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nat. Neurosci.* 3, 120–125.
- Palmer, J.B., Cuss, F.M., and Barnes, P.J. (1986). VIP and PHM and their role in nonadrenergic inhibitory responses in isolated human airways. *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 1985 61, 1322–1328.
- Palmer, J.B., Cuss, F.M., Mulderry, P.K., Ghatei, M.A., Springall, D.R., Cadieux, A., Bloom, S.R., Polak, J.M., and Barnes, P.J. (1987a). Calcitonin gene-related peptide is localised to human airway nerves and potently constricts human airway smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 91, 95–101.
- Palmer, R.M., Ferrige, A.G., and Moncada, S. (1987b). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524–526.
- Parsons, S.M. (2000). Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 14, 2423–2434.
- Parsons, R.L., Locknar, S.A., Young, B.A., Hoard, J.L., and Hoover, D.B. (2006). Presence and co-localization of vasoactive intestinal polypeptide with neuronal nitric oxide synthase in cells and nerve fibers within guinea pig intrinsic cardiac ganglia and cardiac tissue. *Cell Tissue Res.* 323, 197–209.
- Partanen, M., Laitinen, A., Hervonen, A., Toivanen, M., and Laitinen, L.A. (1982). Catecholamine- and acetylcholinesterase-containing nerves in human lower respiratory tract. *Histochemistry* 76, 175–188.
- Pelletier, G., Guy, J., Allen, Y.S., and Polak, J.M. (1984). Electron microscope immunocytochemical localization of neuropeptide Y (NPY) in the rat brain. *Neuropeptides* 4, 319–324.
- Pernow, B. (1983). Substance P. *Pharmacol. Rev.* 35, 85–141.
- Pernow, J. (1988). Co-release and functional interactions of neuropeptide Y and noradrenaline in peripheral sympathetic vascular control. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 568, 1–56.

Pernow, J., and Lundberg, J.M. (1989). Release and vasoconstrictor effects of neuropeptide Y in relation to non-adrenergic sympathetic control of renal blood flow in the pig. *Acta Physiol. Scand.* 136, 507–517.

Pernow, J., Ohlén, A., Hökfelt, T., Nilsson, O., and Lundberg, J.M. (1987). Neuropeptide Y: presence in perivascular noradrenergic neurons and vasoconstrictor effects on skeletal muscle blood vessels in experimental animals and man. *Regul. Pept.* 19, 313–324.

Petermann, J.B., Born, W., Chang, J.Y., and Fischer, J.A. (1987). Identification in the human central nervous system, pituitary, and thyroid of a novel calcitonin gene-related peptide, and partial amino acid sequence in the spinal cord. *J. Biol. Chem.* 262, 542–545.

Petrecca, K., and Shrier, A. (1998). Spatial distribution of nerve processes and beta-adrenoreceptors in the rat atrioventricular node. *J. Anat.* 192 (Pt 4), 517–528.

Pilowsky, P., Llewellyn-Smith, I.J., Minson, J., and Chalmers, J. (1992). Sympathetic preganglionic neurons in rabbit spinal cord that project to the stellate or the superior cervical ganglion. *Brain Res.* 577, 181–188.

Potter, E. (1987). Presynaptic inhibition of cardiac vagal postganglionic nerves by neuropeptide Y. *Neurosci. Lett.* 83, 101–106.

Proskocil, B.J., Sekhon, H.S., Jia, Y., Savchenko, V., Blakely, R.D., Lindstrom, J., and Spindel, E.R. (2004). Acetylcholine is an autocrine or paracrine hormone synthesized and secreted by airway bronchial epithelial cells. *Endocrinology* 145, 2498–2506.

Püschel, G.P., Kühn, H., Kietzmann, T., and Höhne, W. (2011). *Taschenlehrbuch Biochemie* (Georg Thieme Verlag).

Pyner, S., and Coote, J.H. (1995). Arrangement of dendrites and morphological characteristics of sympathetic preganglionic neurones projecting to the superior cervical ganglion and adrenal medulla in adult cat. *J. Auton. Nerv. Syst.* 52, 35–41.

Racké, K., and Matthiesen, S. (2004). The airway cholinergic system: physiology and pharmacology. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 17, 181–198.

De Rada, O.D., Villaro, A.C., Montuenga, L.M., Martínez, A., Springall, D.R., and Polak, J.M. (1993). Nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in human and porcine respiratory tract. *Neurosci. Lett.* 162, 121–124.

Reinecke, M., Weihe, E., and Forssmann, W.G. (1980). Substance P-immunoreactive nerve fibers in the heart. *Neurosci. Lett.* 20, 265–269.

Reinheimer, T., Bernedo, P., Klapproth, H., Oelert, H., Zeiske, B., Racké, K., and Wessler, I. (1996). Acetylcholine in isolated airways of rat, guinea pig, and human: species differences in role of airway mucosa. *Am. J. Physiol.* 270, L722–L728.

Ricciardolo, F.L.M., Nijkamp, F.P., and Folkerts, G. (2006). Nitric oxide synthase (NOS) as therapeutic target for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr. Drug Targets* 7, 721–735.

- Ricco, M.M., Kummer, W., Biglari, B., Myers, A.C., and Undem, B.J. (1996). Interganglionic segregation of distinct vagal afferent fibre phenotypes in guinea-pig airways. *J. Physiol.* 496 (Pt 2), 521–530.
- Richardson, R.J., Grkovic, I., and Anderson, C.R. (2003). Immunohistochemical analysis of intracardiac ganglia of the rat heart. *Cell Tissue Res.* 314, 337–350.
- Rogers, D.F., Aursudkij, B., and Barnes, P.J. (1989). Effects of tachykinins on mucus secretion in human bronchi in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 174, 283–286.
- Rosenberry, T.L. (1975). Acetylcholinesterase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 43, 103–218.
- Rosenfeld, M.G., Mermod, J.J., Amara, S.G., Swanson, L.W., Sawchenko, P.E., Rivier, J., Vale, W.W., and Evans, R.M. (1983). Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* 304, 129–135.
- Van Rossum, D., Hanisch, U.K., and Quirion, R. (1997). Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and functions of CGRP, related peptides and their receptors. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, 649–678.
- Roux, E., Molimard, M., Savineau, J.P., and Marthan, R. (1998). Muscarinic stimulation of airway smooth muscle cells. *Gen. Pharmacol.* 31, 349–356.
- Rudehill, A., Sollevi, A., Franco-Cereceda, A., and Lundberg, J.M. (1986). Neuropeptide Y (NPY) and the pig heart: release and coronary vasoconstrictor effects. *Peptides* 7, 821–826.
- Rugg, E.L., Barnett, D.B., and Nahorski, S.R. (1978). Coexistence of beta1 and beta2 adrenoceptors in mammalian lung: evidence from direct binding studies. *Mol. Pharmacol.* 14, 996–1005.
- Saffrey, M.J., Hassall, C.J., Hoyle, C.H., Belai, A., Moss, J., Schmidt, H.H., Förstermann, U., Murad, F., and Burnstock, G. (1992). Colocalization of nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in cultured myenteric neurones. *Neuroreport* 3, 333–336.
- Said, S.I., and Dickman, K.G. (2000). Pathways of inflammation and cell death in the lung: modulation by vasoactive intestinal peptide. *Regul. Pept.* 93, 21–29.
- Said, S.I., and Mutt, V. (1969). A peptide fraction from lung tissue with prolonged peripheral vasodilator activity. *Scand. J. Clin. Lab. Investig. Suppl.* 107, 51–56.
- Said, S.I., and Mutt, V. (1970a). Potent peripheral and splanchnic vasodilator peptide from normal gut. *Nature* 225, 863–864.
- Said, S.I., and Mutt, V. (1970b). Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science* 169, 1217–1218.
- Saleh, D., Barnes, P.J., and Giaid, A. (1997). Increased production of the potent oxidant peroxynitrite in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155, 1763–1769.

Sanders, K.M., and Ward, S.M. (1992). Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am. J. Physiol.* 262, G379–G392.

Sant’Ambrogio, G., and Widdicombe, J. (2001). Reflexes from airway rapidly adapting receptors. *Respir. Physiol.* 125, 33–45.

Saria, A., Lundberg, J.M., Skofitsch, G., and Lembeck, F. (1983). Vascular protein linkage in various tissue induced by substance P, capsaicin, bradykinin, serotonin, histamine and by antigen challenge. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 324, 212–218.

Schäfer, M.K., Eiden, L.E., and Weihe, E. (1998). Cholinergic neurons and terminal fields revealed by immunohistochemistry for the vesicular acetylcholine transporter. I. Central nervous system. *Neuroscience* 84, 331–359.

Schulz, R., Rassaf, T., Massion, P.B., Kelm, M., and Balligand, J.-L. (2005). Recent advances in the understanding of the role of nitric oxide in cardiovascular homeostasis. *Pharmacol. Ther.* 108, 225–256.

Schulze, W., and Fu, M.L. (1996a). Immunocytochemical localization of muscarinic, adrenergic and AT1 receptors. *Blood Pressure. Supplement* 3, 15–18.

Schulze, W., and Fu, M.L. (1996b). Localization of alpha 1-adrenoceptors in rat and human hearts by immunocytochemistry. *Mol. Cell. Biochem.* 163-164, 159–165.

Sequeira, I.M., Haberberger, R.V., and Kummer, W. (2005). Atrial and ventricular rat coronary arteries are differently supplied by noradrenergic, cholinergic and nitrenergic, but not sensory nerve fibres. *Ann. Anat. Anat. Anz. Off. Organ Anat. Ges.* 187, 345–355.

Severini, C., Improta, G., Falconieri-Erspamer, G., Salvadori, S., and Erspamer, V. (2002). The tachykinin peptide family. *Pharmacol. Rev.* 54, 285–322.

Sheppard, M.N., Polak, J.M., Allen, J.M., and Bloom, S.R. (1984). Neuropeptide tyrosine (NPY): a newly discovered peptide is present in the mammalian respiratory tract. *Thorax* 39, 326–330.

Shields, R.W. (1993). Functional anatomy of the autonomic nervous system. *J. Clin. Neurophysiol. Off. Publ. Am. Electroencephalogr. Soc.* 10, 2–13.

Shimosegawa, T., and Toyota, T. (1994). NADPH-diaphorase activity as a marker for nitric oxide synthase in neurons of the guinea pig respiratory tract. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150, 1402–1410.

Shults, C.W., Quirion, R., Chronwall, B., Chase, T.N., and O’Donohue, T.L. (1984). A comparison of the anatomical distribution of substance P and substance P receptors in the rat central nervous system. *Peptides* 5, 1097–1128.

Sigrist, S., Franco-Cereceda, A., Muff, R., Henke, H., Lundberg, J.M., and Fischer, J.A. (1986). Specific receptor and cardiovascular effects of calcitonin gene-related peptide. *Endocrinology* 119, 381–389.

Smith, J.A., Shah, A.M., and Lewis, M.J. (1991). Factors released from endocardium of the ferret and pig modulate myocardial contraction. *J. Physiol.* 439, 1–14.

Smith, T.W., Balligand, J.L., Kaye, D.M., Wiviott, S.D., Simmons, W.W., Han, X., Michel, T., Singh, K., and Kelly, R.A. (1996). The role of the NO pathway in the control of cardiac function. *J. Card. Fail.* 2, S141–S147.

Snyder, S.H., and Bredt, D.S. (1991). Nitric oxide as a neuronal messenger. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 125–128.

Solway, J., and Leff, A.R. (1991). Sensory neuropeptides and airway function. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 71, 2077–2087.

Sosunov, A.A., Hassall, C.J., Loesch, A., Turmaine, M., and Burnstock, G. (1995). Ultrastructural investigation of nitric oxide synthase-immunoreactive nerves associated with coronary blood vessels of rat and guinea-pig. *Cell Tissue Res.* 280, 575–582.

Springall, D.R., Cadieux, A., Oliveira, H., Su, H., Royston, D., and Polak, J.M. (1987). Retrograde tracing shows that CGRP-immunoreactive nerves of rat trachea and lung originate from vagal and dorsal root ganglia. *J. Auton. Nerv. Syst.* 20, 155–166.

Springall, D.R., Edginton, J.A., Price, P.N., Swanston, D.W., Noel, C., Bloom, S.R., and Polak, J.M. (1990). Acrolein depletes the neuropeptides CGRP and substance P in sensory nerves in rat respiratory tract. *Environ. Health Perspect.* 85, 151–157.

Steele, P.A., and Choate, J.K. (1994). Innervation of the pacemaker in guinea-pig sinoatrial node. *J. Auton. Nerv. Syst.* 47, 177–187.

Steele, P.A., Gibbins, I.L., Morris, J.L., and Mayer, B. (1994). Multiple populations of neuropeptide-containing intrinsic neurons in the guinea-pig heart. *Neuroscience* 62, 241–250.

Steele, P.A., Gibbins, I.L., and Morris, J.L. (1996). Projections of intrinsic cardiac neurons to different targets in the guinea-pig heart. *J. Auton. Nerv. Syst.* 56, 191–200.

Steenbergh, P.H., Höppener, J.W., Zandberg, J., Lips, C.J., and Jansz, H.S. (1985). A second human calcitonin/CGRP gene. *FEBS Lett.* 183, 403–407.

Steenbergh, P.H., Höppener, J.W., Zandberg, J., Visser, A., Lips, C.J., and Jansz, H.S. (1986). Structure and expression of the human calcitonin/CGRP genes. *FEBS Lett.* 209, 97–103.

Sternini, C. (1997). Organization of the peripheral nervous system: autonomic and sensory ganglia. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. Soc. Investig. Dermatol. Inc Eur. Soc. Dermatol. Res.* 2, 1–7.

Sternini, C., and Brecha, N. (1985). Distribution and colocalization of neuropeptide Y- and tyrosine hydroxylase-like immunoreactivity in the guinea-pig heart. *Cell Tissue Res.* 241, 93–102.

Stjärne, L., Lundberg, J.M., and Astrand, P. (1986). Neuropeptide Y--a cotransmitter with noradrenaline and adenosine 5'-triphosphate in the sympathetic nerves of the mouse vas deferens? A biochemical, physiological and electropharmacological study. *Neuroscience* 18, 151–166.

- Stjärne, P., Lundblad, L., Anggård, A., Hökfelt, T., and Lundberg, J.M. (1989). Tachykinins and calcitonin gene-related peptide: co-existence in sensory nerves of the nasal mucosa and effects on blood flow. *Cell Tissue Res.* 256, 439–446.
- Stretton, C.D., and Barnes, P.J. (1988). Modulation of cholinergic neurotransmission in guinea-pig trachea by neuropeptide Y. *Br. J. Pharmacol.* 93, 672–678.
- Tatemoto, K., Carlquist, M., and Mutt, V. (1982). Neuropeptide Y--a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* 296, 659–660.
- Tatemoto, K., Lundberg, J.M., Jörnvall, H., and Mutt, V. (1985a). Neuropeptide K: isolation, structure and biological activities of a novel brain tachykinin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128, 947–953.
- Tatemoto, K., Siimesmaa, S., Jörnvall, H., Allen, J.M., Polak, J.M., Bloom, S.R., and Mutt, V. (1985b). Isolation and characterization of neuropeptide Y from porcine intestine. *FEBS Lett.* 179, 181–184.
- Thiriet, G., Kempf, J., and Ebel, A. (1992). Distribution of cholinergic neurons in the chick spinal cord during embryonic development. Comparison of ChAT immunocytochemistry with AChE histochemistry. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 10, 459–466.
- Thom, S.M., Hughes, A.D., Goldberg, P., Martin, G., Schachter, M., and Sever, P.S. (1987). The actions of calcitonin gene related peptide and vasoactive intestinal peptide as vasodilators in man in vivo and in vitro. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 24, 139–144.
- Tollet, J., Everett, A.W., and Sparrow, M.P. (2002). Development of neural tissue and airway smooth muscle in fetal mouse lung explants: a role for glial-derived neurotrophic factor in lung innervation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26, 420–429.
- Uddman, R., and Sundler, F. (1986). Innervation of the upper airways. *Clin. Chest Med.* 7, 201–209.
- Uddman, R., and Sundler, F. (1987). Neuropeptides in the airways: a review. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136, S3–S8.
- Uddman, R., Alumets, J., Densert, O., Håkanson, R., and Sundler, F. (1978a). Occurrence and distribution of VIP nerves in the nasal mucosa and tracheobronchial wall. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 86, 443–448.
- Uddman, R., Alumets, J., Edvinsson, L., Håkanson, R., and Sundler, F. (1978b). Peptidergic (VIP) innervation of the esophagus. *Gastroenterology* 75, 5–8.
- Uddman, R., Sundler, F., and Emson, P. (1984). Occurrence and distribution of neuropeptide-Y-immunoreactive nerves in the respiratory tract and middle ear. *Cell Tissue Res.* 237, 321–327.
- Uddman, R., Luts, A., and Sundler, F. (1985). Occurrence and distribution of calcitonin gene-related peptide in the mammalian respiratory tract and middle ear. *Cell Tissue Res.* 241, 551–555.

Usdin, T.B., Eiden, L.E., Bonner, T.I., and Erickson, J.D. (1995). Molecular biology of the vesicular ACh transporter. *Trends Neurosci.* 18, 218–224.

Uvnas, B. (1954). Sympathetic vasodilator outflow. *Physiol. Rev.* 34, 608–618.

Van der Velden, V.H., and Hulsmann, A.R. (1999). Autonomic innervation of human airways: structure, function, and pathophysiology in asthma. *Neuroimmunomodulation* 6, 145–159.

V Euler, U.S., and Gaddum, J.H. (1931). An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J. Physiol.* 72, 74–87.

Wahlestedt, C., Wohlfart, B., and Håkanson, R. (1987). Effects of neuropeptide Y (NPY) on isolated guinea-pig heart. *Acta Physiol. Scand.* 129, 459–463.

Wakisaka, S., Miyawaki, Y., Youn, S.H., Kato, J., and Kurisu, K. (1996). Protein gene-product 9.5 in developing mouse circumvallate papilla: comparison with neuron-specific enolase and calcitonin gene-related peptide. *Anat. Embryol. (Berl.)* 194, 365–372.

Walker, P., Grouzmann, E., Burnier, M., and Waeber, B. (1991). The role of neuropeptide Y in cardiovascular regulation. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 111–115.

Wallis, D., Watson, A.H., and Mo, N. (1996). Cardiac neurones of autonomic ganglia. *Microsc. Res. Tech.* 35, 69–79.

Wang, Y., and Marsden, P.A. (1995). Nitric oxide synthases: biochemical and molecular regulation. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 4, 12–22.

Ward, J.K., Belvisi, M.G., Fox, A.J., Miura, M., Tadjkarimi, S., Yacoub, M.H., and Barnes, P.J. (1993). Modulation of cholinergic neural bronchoconstriction by endogenous nitric oxide and vasoactive intestinal peptide in human airways in vitro. *J. Clin. Invest.* 92, 736–742.

Ward, J.K., Barnes, P.J., Springall, D.R., Abelli, L., Tadjkarimi, S., Yacoub, M.H., Polak, J.M., and Belvisi, M.G. (1995). Distribution of human i-NANC bronchodilator and nitric oxide-immunoreactive nerves. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 13, 175–184.

Weichselbaum, M., Everett, A.W., and Sparrow, M.P. (1996). Mapping the innervation of the bronchial tree in fetal and postnatal pig lung using antibodies to PGP 9.5 and SV2. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 15, 703–710.

Weigand, L.A., and Myers, A.C. (2010a). Synaptic and membrane properties of parasympathetic ganglionic neurons innervating mouse trachea and bronchi. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 298, L593–L599.

Weigand, L.A., and Myers, A.C. (2010b). Synaptic and membrane properties of parasympathetic ganglionic neurons innervating mouse trachea and bronchi. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 298, L593–L599.

Weihe, E., and Reinecke, M. (1981). Peptidergic innervation of the mammalian sinus nodes: vasoactive intestinal polypeptide, neurotensin, substance P. *Neurosci. Lett.* 26, 283–288.

- Weihe, E., Reinecke, M., and Forssmann, W.G. (1984). Distribution of vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactivity in the mammalian heart. Interrelation with neurotensin- and substance P-like immunoreactive nerves. *Cell Tissue Res.* 236, 527–540.
- Welches, W.R., Brosnihan, K.B., and Ferrario, C.M. (1993a). A comparison of the properties and enzymatic activities of three angiotensin processing enzymes: angiotensin converting enzyme, prolyl endopeptidase and neutral endopeptidase 24.11. *Life Sci.* 52, 1461–1480.
- Welches, W.R., Brosnihan, K.B., and Ferrario, C.M. (1993b). A comparison of the properties and enzymatic activities of three angiotensin processing enzymes: angiotensin converting enzyme, prolyl endopeptidase and neutral endopeptidase 24.11. *Life Sci.* 52, 1461–1480.
- Wess, J., Eglen, R.M., and Gautam, D. (2007). Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 721–733.
- Wessler, I., and Kirkpatrick, C.J. (2008). Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br. J. Pharmacol.* 154, 1558–1571.
- Wessler, I.K., and Kirkpatrick, C.J. (2001). The Non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 14, 423–434.
- Wessler, I., Kirkpatrick, C.J., and Racké, K. (1998). Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. *Pharmacol. Ther.* 77, 59–79.
- Wessler, I., Kirkpatrick, C.J., and Racké, K. (1999). The cholinergic “pitfall”: acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26, 198–205.
- Wessler, I., Kilbinger, H., Bittinger, F., and Kirkpatrick, C.J. (2001). The biological role of non-neuronal acetylcholine in plants and humans. *Jpn. J. Pharmacol.* 85, 2–10.
- Wharton, J., Polak, J.M., McGregor, G.P., Bishop, A.E., and Bloom, S.R. (1981). The distribution of substrate P-like immunoreactive nerves in the guinea-pig heart. *Neuroscience* 6, 2193–2204.
- Wharton, J., Gulbenkian, S., Merighi, A., Kuhn, D.M., Jahn, R., Taylor, K.M., and Polak, J.M. (1988). Immunohistochemical and ultrastructural localisation of peptide-containing nerves and myocardial cells in the human atrial appendage. *Cell Tissue Res.* 254, 155–166.
- Wharton, J., Polak, J.M., Gordon, L., Banner, N.R., Springall, D.R., Rose, M., Khagani, A., Wallwork, J., and Yacoub, M.H. (1990). Immunohistochemical demonstration of human cardiac innervation before and after transplantation. *Circ. Res.* 66, 900–912.
- White, M.V. (1995). Muscarinic receptors in human airways. *J. Allergy Clin. Immunol.* 95, 1065–1068.

- Widdicombe, J.G. (1990). The NANC system and airway vasculature. *Arch. Int. Pharmacodyn. Thérapie* 303, 83–99.
- Widdicombe, J.G. (1996). Neuroregulation of the nose and bronchi. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 26 *Suppl* 3, 32–35.
- Widdicombe, J.G. (1998). Autonomic regulation. i-NANC/e-NANC. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158, S171–S175.
- Widdicombe, J.G., and Wells, U.M. (1994). Vagal Reflexes. In *Airways Smooth Muscle*, D.D. Raeburn, and D.M.A. Giembycz, eds. (Birkhäuser Basel), pp. 279–307.
- Widdicombe, J.G., Kent, D.C., and Nadel, J.A. (1962). Mechanism of bronchoconstriction during inhalation of dust. *J. Appl. Physiol.* 17, 613–616.
- Wilkinson, K.D., Lee, K.M., Deshpande, S., Duerksen-Hughes, P., Boss, J.M., and Pohl, J. (1989). The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. *Science* 246, 670–673.
- Wojtarowicz, A., Podlasz, P., and Czaja, K. (2003). Adrenergic and cholinergic innervation of pulmonary tissue in the pig. *Folia Morphol.* 62, 215–218.
- Wu, D., and Hersh, L.B. (1994). Choline acetyltransferase: celebrating its fiftieth year. *J. Neurochem.* 62, 1653–1663.
- Xie, Q., Itoh, M., Miyamoto, K., Li, L., and Takeuchi, Y. (1999). Cardiac afferents to the nucleus of the tractus solitarius: A WGA-HRP study in the rat. *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg. Off. J. Assoc. Thorac. Cardiovasc. Surg. Asia* 5, 370–375.
- Yamamoto, Y., Ootsuka, T., Atoji, Y., and Suzuki, Y. (1998). Morphological and quantitative study of the intrinsic nerve plexuses of the canine trachea as revealed by immunohistochemical staining of protein gene product 9.5. *Anat. Rec.* 250, 438–447.
- Yaoita, H., Sato, E., Kawaguchi, M., Saito, T., Maehara, K., and Maruyama, Y. (1994). Nonadrenergic noncholinergic nerves regulate basal coronary flow via release of capsaicin-sensitive neuropeptides in the rat heart. *Circ. Res.* 75, 780–788.
- Yokosawa, H., Endo, S., Ohgaki, Y., Maeyama, J., and Ishii, S. (1985). Hydrolysis of substance P and its analogs by angiotensin-converting enzyme from rat lung. Characterization of endopeptidase activity of the enzyme. *J. Biochem. (Tokyo)* 98, 1293–1299.
- Young, A. (2005). Receptor pharmacology. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* 52, 47–65.
- Zhu, L., Wang, W.Z., Jin, X.H., Zhao, R.R., Hjalmarson, A., and Fu, M.L. (1996). Immunocytochemical studies of M2 muscarinic receptors in guinea pig atria and ventricles using anti-peptide antibodies. *Blood Pressure. Supplement* 3, 19–21.

12. Eidesstattliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

13. Danksagung

Ich danke Prof. Dr. W. Kummer für das Überlassen des Themas, für seine Geduld über die gesamte Zeit hinweg, für die unzähligen Treffen und Telefonate, die stets Klarheit brachten und mich mit der notwendigen Zuversicht erfüllten.

Danke auch an Tamara Papadakis und Martin Bodenbenner-Türich, die mir die nötigen praktischen Fertigkeiten im Labor beibrachten und mir stets mit Rat und Tat und guter Laune zur Seite standen.

Ein ganz herzliches Dankeschön an Frau Patricia Berger, die nicht nur stets ein liebes Wort parat hatte, sondern mir auch bei den administrativen Herausforderungen zur Seite stand.

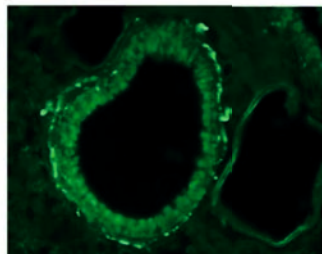
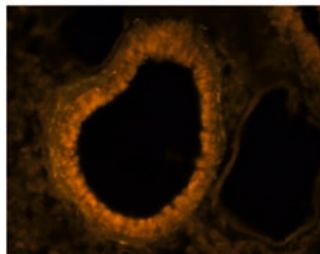
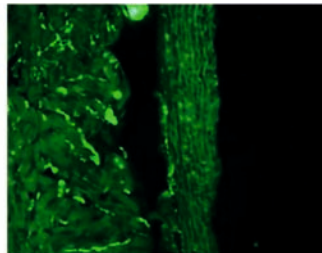
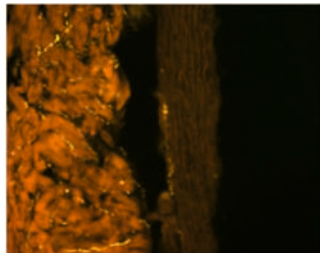
Ich danke ganz besonders meinen Eltern, die mit all ihren Taten mir Türen geöffnet und diese Arbeit somit erst möglich gemacht haben. Danke für eure bedingungslose Unterstützung.

Meinem Bruder, Dr. med. Johann Klein, möchte ich für seine Motivation, konstruktive Kritik und das (un)freiwillige Korrekturlesen danken.

Nicht zuletzt ein ganz besonderes Dankeschön an Tom und Vincent, ohne deren Liebe, Geduld, Motivation und mehr Zuversicht, als ich sie hatte, die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6467-9



9 78 3 8359 6467 9